



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Katrina Lang

**SÄGA (*SILURUS GLANIS* L.) LOODUSLIKU
POPULATSIOONI JA EESTISSE IMPORDITUD
KASVANDUSTE KARJADE GENEETILINE
ISELOOMUSTAMINE**

**GENETIC CHARACTERIZATION OF NATIVE POPULATION
AND IMPORTED FARMED STOCKS OF WELS CATFISH
(*SILURUS GLANIS* L.) IN ESTONIA**

Magistritöö
Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia õppekava

Juhendajad: professor Riho Gross, PhD
teadur Lilian Pukk, PhD

Tartu 2018

Eesti Maaülikool		Magistriastme uurimistöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1a, Tartu 51014			
Autor: Katrina Lang		Õppekava: Vee ja maismaa ökosüsteemide rakendusbioloogia	
Pealkiri: Säga (<i>Silurus glanis</i> L.) loodusliku populatsiooni ja Eestisse imporditud kasvanduste karjade geneetiline iseloomustamine			
Lk: 77	Jooniseid: 12	Tabeleid: 10	Lisasid: 2
Osakond:		Vesiviljeluse õppetool	
ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood:		Geneetika, B220	
Juhendaja(d):		Riho Gross Lilian Pukk	
Kaitsmiskoht ja aasta:		Tartu 2018	
<p>Säga on Eestis haruldane liik, kuuludes II kaitsekategooriasse ning Eesti Punase Raamatu eriti ohustatud liikide nimistusse. Tema geneetiliste iseärasuste väljaselgitamine on väga oluline geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks või taastamiseks nii looduslikes populatsioonides kui kasvanduse karjades. Magistritöö eesmärkideks oli välja selgitada säga loodusliku Peipsi populatsiooni ja Eestisse imporditud kasvanduste karjade geneetilised iseärasused ja hinnata kasvanduse karjade sobivust loodusliku populatsiooni täiendamiseks. Geneetiliste markeritena kasutati mitokondriaalse DNA (mtDNA) kahe piirkonna (ND5/6 ja CytB/D-ling) restriksioonifragmentide pikkuspolümorfismi (RFLP), mtDNA D-lingu nukleotiidset järjestust ja rakutuuma DNA lühikesi tandemseid korduvjärjestusi ehk mikrosatelliite. Uurimistöö tulemusena leidis kinnitust hüpotees, et Peipsi looduslik sägapopulatsioon ja Lätist ning Leedust pärinevad Eesti kalakasvanduste sägakarjad on emaliinide poolest üksteisega geneetiliselt sarnased ja erinevad teiste Euroopa piirkondade varem uuritud populatsioonidest. Samuti leidis osaliselt kinnitust teine hüpotees, mille kohaselt võiks Läti ja Leedu päritolu sägakarjad sobida Peipsi loodusliku sägapopulatsiooni täiendamiseks. Geneetiliste markerite analüüsi tulemustest selgus, et geneetiliselt kõige varieeruvam on Lapavira kasvanduse Leedu päritolu sägakari, mis mikrosatelliitide analüüsi põhjal on ka kõige sarnasem Peipsi populatsioonile. Seetõttu võiks just Lapavira sägakari olla kõige sobivam Peipsi järve populatsiooni täiendamiseks, võimaldades suurendada selle geneetilist variatsiooni ja likvideerida inbriidingut.</p>			
Märksõnad: säga, mitokondriaalne DNA, rakutuuma DNA, kalakarjad, populatsioon			

Estonian University of Life Sciences		Abstract of Master's studies	
Kreutzwaldi 1a, Tartu 51014			
Author: Katrina Lang		Specialty: Applied biology of aquatic and terrestrial ecosystems	
Title: Genetic characterization of native population and imported farmed stocks of wels catfish (<i>Silurus glanis</i> L.) in Estonia			
Pages: 77	Figures: 12	Tables: 10	Appendixes: 2
Department: Field of research and (CERC S) code: Supervisor:		Chair of Aquaculture Genetics, B220 Riho Gross Lilian Pukk	
Place and date:		Tartu, 2018	
<p>Wels catfish (<i>Silurus glanis</i> L.) is an endangered species in Estonia who is protected by Nature Conservation Act and also belongs to Red Data Book. Genetic characterization of wels catfish populations is important for species restoration programmes and aquaculture. The aim of this thesis was to characterise genetically wels catfish (<i>Silurus glanis</i> L.) native population and imported farmed stocks in Estonia by using mitochondrial (mtDNA) and nuclear DNA (nDNA) variations. MtDNA variations were studied using PCR-RFLP analysis of ND5/6 and CytB/D-loop regions, and by sequencing of the D-loop, while nDNA variations were characterised using 20 microsatellite loci.</p> <p>The results of this study confirmed our first hypothesis that the native Peipsi population and the farmed stocks which were imported to Estonia from Latvia and Lithuania are genetically similar by maternal lines and differ from previously studied wels catfish populations in other parts of Europe. Also we were partially able to confirm our second hypothesis which stated that the imported farmed wels catfish stocks which originated from Latvia and Lithuania could be genetically suitable for enhancing the native lake Peipsi population in Estonia. Analysis of genetic markers showed that the Lapavira stock which originated from Lithuania was genetically the most variable among studied stocks and it was also the most similar to Peipsi native population. Therefore, it would be the most suitable for enhancing the native lake Peipsi population, allowing to increase its genetic variation and to liquidate the accumulated inbreeding.</p>			
Keywords: wels catfish, mitochondrial DNA, nuclear DNA, fish stocks, population			

Kaitsmisele lubatud "....." 20.... a EMÜ Põllumajandus- ja
Keskkonnainstituudi õppedirektor/õppekava juht.....
Bakalaureuse-/magistritöö juhendaja:.....

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	6
KASUTATUD MÕISTED.....	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	13
1.1. Säga bioloogia.....	13
1.1.1. Säga süstemaatiline kuuluvus.....	13
1.1.2. Kirjeldus ja iseloomulikud tunnused	13
1.1.3. Levik ja elupaik	14
1.2. Looduslike sägapopulatsioonide seisund Euroopas.....	16
1.2.1. Looduslike populatsioonide täiendamine	17
1.3. Ülevaade säga kasvatamisest Euroopas ja Eestis	18
1.4. Säga geneetiline populatsioonistruktuur	19
1.4.1. Liigisisese geneetilise mitmekesisuse hindamise teoreetilised alused	19
1.4.2. Geneetilised markerid.....	20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	29
2.1. Materjal ja metoodika	29
2.1.1. Proovide kogumine.....	29
2.1.2. DNA eraldamine ja geneetiliste markerite analüüs	31
2.1.3. Andmete analüüs	36
2.2. TULEMUSED	39
2.2.1. MtDNA PCR-RFLP	39
2.2.2. MtDNA D-ling	47
2.2.3. Mikrosatelliitmarkerid	52
2.3. ARUTELU	57
KOKKUVÕTE.....	62
KASUTATUD KIRJANDUS	64
SUMMARY	70
LISAD	73
Lisa 1. Joondatud säga D-lingu haplotüüpide järjestused.	74
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks (avaldamise tähtajatu piirang) ning juhendaja(te) kinnitus töö kaitsmisele lubamise kohta.....	77

SISSEJUHATUS

Üha kasvav inimpopulatsioon ja aina suurenev nõudlus värske kala järele on looduslikud kalapopulatsioonid viinud tasemeni, kust veeorganismide püüki enam suurendada ei saa ning inimkonna toitmiseks vajatakse alternatiivseid lahendusi. Üheks võimaluseks on vesiviljelus ehk akvakultuur, mis võimaldab toota suurel hulgal kalatooteid ning seda võrdlemisi lühikese aja jooksul. Tänapäeval on välja töötatud kalakasvatusmeetodeid, mis lähtuvad keskkonnanohiupõhimõtetest ning on väga efektiivsed. ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 2013) andmetel ületas vesiviljeluse toodang merest püütava juba 2013. aastal, kus saagi kogused olid vastavalt 97 ja 93 miljonit tonni.

Geneetiliste meetodite abil saab uurida looduslike kalapopulatsioonide seisundit ning anda teavet nende geneetilise mitmekesisuse, inbriidinguohu ja muude üleekspluateerimist kiirendavate aspektide kohta. Sellest lähtuvalt saab liikidele rakendada kaitsemeetmeid, et populatsioonid säiliks elujõulistena (Beaumont *et al.* 2010). Üheks kaitsemeetmeks on looduslike populatsioonide täiendamine või taastamine kasvandustes kasvatavate kaladega, seda on Eestis tehtud näiteks lõhe (*Salmo salar*), meriforelli (*Salmo trutta trutta*) ja angerja (*Anguilla anguilla*) puhul, kuid samuti on tekkinud püügihuvi ka mitme kaitsealuse liigi vastu, nagu seda on tõugjas (*Aspius aspius*), harjus (*Thymallus thymallus*) ja säga (*Silurus glanis*) (Paaver *et al.* 2006). Samuti on vesiviljeluses oluline omada teadmisi kalade geneetilisest iseärasustest ja potentsiaalset ning sellest lähtuvalt rakendada aretusvõtteid, mille abil saab suurendada söödakasutusefektiivsust, kasvukiirust, haiguskindlust, liha kvaliteeti ja muid majanduslikult olulisi näitajaid ning lõppkokkuvõttes suurendada produktsiooni (Gross, 2015).

Säga leidub Eesti kalakasvandustes ja looduslikes veekogudes vähe, küll aga on olukord vastupidine Euroopas, kus teda kasvatakse aastas 2000 tonni (Linhart *et al.* 2002) ja tema looduslikud populatsioonid on arvukamad. Säga on huvitav kasvatusobjekt, kuna kasvab optimaalsetes tingimustes väga kiiresti (Kamangar, Rostamzadeh 2015). Liik võiks olla põnev püügiobjekt nii kutselistele kui ka harrastuskalastajatele, kuid hetkel kuulub säga Eesti Punase Raamatu (Eesti Punane... 2008) ohustatud liikide hulka ning tema püük on aastaringelt keelatud. Kuna säga leidub Eesti veekogudes väga vähe ja andmeid on ainult

üksikute tabamiskordade kohta, on teda siin minimaalselt uuritud. Info säga looduslike populatsioonide ja kasvanduse karjade geneetilise mitmekesisuse ja struktuuri kohta kogu Läänemere vesikonnas on puudulik - varem on geneetiliste markerite (allosüümide, mitokondriaalse DNA ja mikrosatelliitide) abil uuritud peamiselt vaid Musta ja Kaspia mere ning Vahemere vesikondade populatsioone (Triantafyllidis *et al.* 1999a; Triantafyllidis *et al.* 1999b; Krieg *et al.* 2000, Triantafyllidis *et al.* 2002), Läänemere vesikonnas on uuritud mikrosatelliitmarkeritega vaid Rootsi sägapopulatsioone (Jansson 2012; Vinterstare 2017). Geneetilise info olemasolu on aga äärmiselt oluline nii liigi kasvatamise kui looduskaitse seisukohalt. Kuna säga looduslike populatsioonide arvukus on Eestis väga madal ja kohalikku päritolu sugukarja moodustamine on seetõttu küsitav, siis võiks üheks lahenduseks olla populatsioonide täiendamine naabermaadest pärit sägade abil. Eesti kalakasvanduste sägakarjad pärinevadki Lätist ja Leedust, kuid enne asustamist Eesti veekogudesse on vajalik hinnata nende geneetilist sobivust meie sägapopulatsiooni täiendamiseks.

Sellest tulenevalt on käesoleva töö eesmärgiks välja selgitatada Eestis kasvatatavate sägakarjade geneetilised iseärasused võrreldes Peipsi järve ja teiste Euroopa populatsioonidega ning hinnata nende sobivust Eesti loodusliku populatsiooni täiendamiseks. Üheks geneetiliseks markeriks valiti mitokondriaalse DNA (mtDNA) kahe piirkonna (ND5/6 ja CytB/D-ling) restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism (RFLP), sest sama meetodit on varem kasutatud Musta ja Kaspia mere ning Vahemere basseini sägapopulatsioonide uurimisel (Krieg *et al.* 2000) ning erinevalt mikrosatelliitmarkeritest ei eelda selle markeri kasutamine laborite vahelist metoodika kalibreerimist. Samuti määrasime mtDNA D-lingu nukleotiidses järjestuses, et detailsemalt uurida selle piirkonna variatsioone. Lisaks kasutasime Peipsi järve ja Eestis kasvatatavate sägakarjade rakutuumade DNA geneetilise varieeruvuse iseloomustamiseks ka lühikesi tandeemseid korduseid ehk mikrosatelliitmarkereid, sest mtDNA pärandub vaid mööda emaliini ja ei võimalda seetõttu iseloomustada isaliinide panust kogu geneetilisse variatsiooni.

Püstitasime hüpoteesi, et Peipsi looduslik sägapopulatsioon ja Eesti kalakasvanduste sägakarjad on emaliinide poolest üksteisega geneetiliselt sarnased ja erinevad teiste Euroopa piirkondade varem uuritud populatsioonidest. Lisaks, Läti ja Leedu päritolu kasvanduste sägakarjad võivad geneetilise sarnasuse tõttu sobida Peipsi loodusliku sägapopulatsiooni täiendamiseks.

Eelpooltõudud hüpoteesi kinnitamiseks või ümber lükkamiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Selgitada välja Peipsi looduslikus sägapopulatsioonis ja kasvanduste sägakarjades esinevad mtDNA haplotüübid ning nende sugulus mujal Euroopas esinevate mtDNA haplotüüpidega;
2. Selgitada välja Peipsi loodusliku populatsiooni ja kasvanduste sägakarjade geneetiline varieeruvus, diferentseeritus ja sarnasus, et hinnata kasvanduse karjade sobivust meie loodusliku populatsiooni tugevdamiseks ja täiendamiseks.

Avaldan tänu oma juhendajatele Riho Grossile ja Lilian Pukkile, samuti olen tänulik Kerli Haugjärvele abi eest laboratoorsel tööl ning Siim Kaharile ja Heiki Jaanuskale toe eest koeproovide kogumisel. Tänuõnad ka Kuldar Kõivule, kes koos Riho Grossiga töötas säga jaoks välja uued mikrosatelliitmarkerid. Tunnustan ettevõtteid Lapavira OÜ, Störfisch OÜ, Karilatsi Kalamajand OÜ, Kalatalu Härjanurmes ja TÜ Eesti Mereinstituuti, kes lubasid mul võtta koeproove oma kaladelt. Samuti ütlen aitäh kutselistele kaluritele (eripüügiluba nr 56/2016), kelle abiga kogusime koeproove Eesti päritolu sägadelt.

Uurimistöö toimus mitme projekti rahalisel toel: Institutsionaalne uurimistoetus IUT8-2 "Populatsioonigeneetika, genoomika ja transkriptomika rakendused kalade ja põllumajandusloomade geneetilise mitmekesisuse ja lokaalsete adaptatsioonide uuringutes" (1.01.2013–31.12.2018); kaks Keskkonnaministeeriumi siseriiklikku lepingut: "Kalade taastootmise alased uuringud 2016" (1.05.2016–30.04.2017) ja "Kalade taastootmise alased uuringud 2017" (1.05.2017–30.04.2018); Euroopa Merendus- ja Kalandusfondi rakenduskava 2014–2020 meetme 2.1 „Vesiviljeluse innovatsioonitoetus“ projekt nr 8-10/97 „Säga (*Silurus glanis*) kui perspektiivse uue vesiviljelusliigi kunstliku paljundamise ja kasvatamise tehnoloogiate väljaarendamine ning parimate omadustega liinide väljaselgitamine“ (01.07.2017–31.08.2022), millede puhul on olnud või on vastutav täitja Riho Gross.

KASUTATUD MÕISTED

Alleel – kromosoomi lookuses olev üks kahest või mitmest alternatiivsest geeniteisendist, mis tähistatakse sama põhisümboliga (nt. alleelid a⁺ ja a) (Heinaru 2012).

Allosüüm – ehk alloensüüm sama geeni eri alleelidest kodeeritud ensüümivariandid. Võivad olla eristatavad ensümaatilise aktiivsuse alusel ja elektroforeesil (Heinaru 2012).

Aluspaarid – DNA nukleotiidipaarid, kus lämmastikalused on vesiniksidemetega paardunud. A:T-paaris on kaks ja G:C-paaris kolm H-sidet (Heinaru 2012).

Amplifikatsioon – DNA- (või RNA-) molekulide paljundamine (Heinaru 2012).

Asustamine – kalade ja teiste veeorganismide laskmine veekogudesse (Baikov *et al.* 2017).

Deletsioon – kromosoomi segmendi puudumine, mis vähendab lookuste arvu (Heinaru 2012).

Denaturatsioon – makromolekuli loomuliku konformatsiooni kaotamine, millega koos kaob tavaliselt ka bioloogiline aktiivsus (Heinaru 2012).

Diferentseerumine – protsess, mille tõttu täielikult või osaliselt isoleeritud populatsioonides toimub allelisagedustes erinevuste akumulatsioon, seda põhjustavad evolutsioonilised mõjurid nagu näiteks selektsioon või geenitriiv (McGraw 2003).

DNA – desoksüribonukleinhape on polümeer, millest geenid koosnevad ning mis kannab geneetilist informatsiooni (Heinaru 2012).

DNA-järjestus – nukleotiidijärgkide omavaheline järjestus DNA-ahelates (Heinaru 2012).

Ekstensiooniivmeetod – kalakasvatustehnoloogia, kus kalu kasvatatakse looduslikku veekogu meenutavates tehisrajatistes (tiikides) inimese poolt vaid osaliselt kontrollitavates tingimustes. Kalade asustustihedus on väike, valdav osa kalade toidust tuleb veekogu looduslikust bioproduktisioonist (Paaver *et al.* 2006).

Geen – spetsiifilise bioloogilise funktsiooniga geneetiline determinant. Pärilikkuse ühik, mis asub kromosoomi kindlas punktis (lookuses). DNA segment, mis kodeerib mingit kindlat RNA-d ja mRNA kaudu kindlat polüpeptiidi ning mida saab eksperimentaalselt eristada cis-trans- või komplementatsioonitestiga (Heinaru 2012).

Geenitriiv – allelisageduste muutus väikese ristuva populatsiooni põlvkondades juhuslike kõrvalekallete tõttu (Heinaru 2012).

Genitaalpapill – genitaalnäsa, suguava ümbritsev näsa (Mikelsaar 1984).

Genoom – täiskompleks kromosoomide (ja seega geene), mis pärandub terviküksusena ühelt vanemalt (Heinaru 2012).

Genotüüp – organismi geenide kogum (Heinaru 2012).

Haplotüüp – tihedalt aheldunud geneetiliste elementide (nt. eri lookuste, kindlate alleelide) järjestus kromosoomis, mis pärandub ühtse üksusena (Heinaru 2012).

Heterosügootsus – erinevate alleelide olemasolu homoloogsete kromosoomide samas lookuses. Harilikult suurendab heterosügootsus organismi eluvõimelisust (Eesti Entsüklopeedia 2006).

Ihtüofauna – on kalastik, kalafauna (Masing 1992).

In vitro – bioloogilise protsessi katseline läbiviimine või vaatlus organismiväliselt, katseklaasis (Heinaru 2012).

Inbriiding – sugulastevahelised ristamised (Heinaru 2012).

Insertsioon – mutatsioonitüüp, kus kromosoomi või geeni struktuuri siseneb üleliigne kromosoomiosa (tavaliselt teisest kromosoomist) või DNA-lõik (üks või mitu uut aluspaari). Nimetatakse ka transposooni sisenemiseks (Heinaru 2012).

Kodominantsed alleelid – mõlemad alleelid osalevad tunnuse väljakujunemisel teineteisest sõltumatult, andes heterosügootses olekus iseseisva tunnuse (Heinaru 2012).

Komplementaarsus – täiendavus, DNA kaksikheeliksi kahe ahela vastastikune täiendavus, mis põhineb kindlate lämmastikualuste paardumisel tänu moodustuvatele vesiniksidemetetele (Heinaru 2012).

Konsensusjärjestus – nukleotiidijärjestus, mis esineb enamikul geneetilistel signaalidel või enamikus elementides ning mis täidab kindlat funktsiooni (Heinaru 2012).

Kromosoomid – eukarüootsetes rakkudes mitoosi või meioosi ajal nähtavad valkudega kondenseerunud DNA-molekulid (nukleoproteiinsed kepjad kehakesed). Kromosoomide arv rakkudes on liigispetsiifiline. Igas kromosoomis paiknevad geenid lineaarses järjestuses (Heinaru 2012).

Lookus – geeni asukoht kromosoomis (Heinaru 2012).

Lookusheterogeensus – geneetiline heterogeensus, kus sama fenotüüpi määratakse erinevate alleelide või mittealleelsete lookuste mutatsioonidega (Heinaru 2012).

Matriits – DNA säilitab kodeeritud informatsiooni ning toimib kui mudel või matriits, millelt kopeeritakse komplementaarse DNA-ahel või transkribeeritakse see RNA-ks (Heinaru 2012).

Mikrosatelliitmarkerid – koosnevad tandeemselt korratud lühikestest (1-6 aluspaari pikkustest) lihtsatest motiividest, sellest ka nende nimetus lihtne tandeemne kordus ehk STR (ingl. *short tandem repeat*) (Eesti Biokeskus 1986).

Mitokondriaalne DNA – (mtDNA) rõngakujuline DNA-molekul mitokondrites, mis pärandub järglastele munaraku tsütoplasma vahendusel (pärandumine emaliini pidi) (Heinaru 2012).

Mutatsioon – organismi kindlas kromosoomilookuses toimuv DNA muutus. Terminit kasutatakse laiaulatuslikult, ta sisaldab nii punkt- kui ka kromosoommutatsioone (kromosoomide struktuuri muutus). Kromosoomistiku arvulisi muutusi nimetatakse genoommutatsioonideks (Heinaru 2012).

Nullalleel – geeni mutantne vorm, mis ei tooda geeni produkti või moodustuv produkt on totaalselt mittefunktsionaalne (Heinaru 2012).

Panmiktiline populatsioon – populatsioon, kus ristumised toimuvad genotüüpide vahel juhuslikult (Heinaru 2012).

PCR – ehk polümeraasi ahelreaktsioon (ingl. *Polymerase chain reaction*) on kindla DNA-järjestuse amplifikatsioon *in vitro* tingimustes, mis toimub paljukordse denaturatsiooni, oligonukleotiidsete praimerite hübridatsiooni ja polünukleotiidi sünteesi tsüklite tulemusel (Heinaru 2012).

Poised – paljudel kalaliikidel suu ümbruses esinevad lühemad või pikemad rohkete maitsmisrakkudega kaetud jätked (Mikelsaar 1984).

Polümorfism – kahe või enama geneetilise variandi olemasolu populatsiooni isendite hulgas, kusjuures vähemalt kahe variandi sagedus on suurem kui 1% (Heinaru 2012).

Populatsioon – ehk asurkond on ühe kalaliigi isendite kogum, mida ühendab ühine päritolu ning sarnane genofond ning mis on naaberpopulatsioonist suhteliselt isoleeritud geograafiliste barjääride või käitumuslike iseärasuste jt ristumisbarjääri tekitavate tegurite kaudu (Paaver *et al.* 2006).

Praimer – lühike reaktiivse 3'-OH-grupiga nukleotiidjärjestus, millelt initsieeritakse matriitsahela alusel DNA süntees (Heinaru 2012).

Pudelikaela efekt – geenitriivi erivorm, mille puhul populatsiooni arvukus on ajutiselt drastiliselt alanenud (Heinaru 2012).

Punktmuutatsioon – muutus, mis toimub geeni kindlas punktis (saidis). Üksik(ud) nukleotiidipaar(id) asendatakse, lisanduvad või langevad välja (Heinaru 2012).

Rajajaefekt – arendajaefekt, emapopulatsioonist irdunud indiviidide grupp, kes paneb aluse uue populatsiooni tekkele. Geenitriivi erimehhanism (Heinaru 2012).

Rekombinatsioon – vanematel mitteesinevate geenikombinatsioonide teke mittehomoogsete kromosoomide ümberkombineerumisel ja homoogsete kromosoomide ristisirdel meiosis. Aheldunud geenidel määratakse rekombinatsioonisageduste alusel geneetilisel kaardil nende geenide omavaheline kaugus (Heinaru 2012).

Replikatsioon – duplikatsiooniprotsess, mis leiab aset matriitsilt kopeerimise tulemusel (Heinaru 2012).

Restriktsioonifragmentide pikkuspolümorfism – (RFLP ingl. *restriction fragment length polymorphism*) kahe või enama geneetilise pikkusvariandi esinemine genoomse DNA restriktsioonil (Heinaru 2012).

Ribosoom – tsütoplasma organell, mis koos mRNA-ga on valgusünteesi kohaks raku tsütoplasmas (Heinaru 2012).

Ribosoomi-RNA – (rRNA) mitut tüüpi RNA molekulid, mis on ribosoomide struktuurikomponentideks (Heinaru 2012).

RNA – ribonukleiinhape on molekul, mis moodustub DNA transkriptsioonil ja mis kannab informatsiooni valgusünteesiks (mRNA), rakusiseseks struktuuriks (rRNA), aminohapete transpordiks (tRNA) või iseenda ning teiste RNA-molekulide biokeemiliseks sünteesiks, modifikatsiooniks ja geenide avaldumise regulatsiooniks (Heinaru 2012).

Sama- ehk ühesuvised kalad – asustuskalade vanuserühm, mida on kasvatatud kalakasvanduses esimese kasvusuve vältel (lühendatult 0+) (Baikov *et al.* 2017).

Sekveneerimine – ehk järjendamine on koondnimetus meetoditest, millega määratakse nukleiinhapete nukleotiidne järjestus ja polüpeptiidide aminohappeline järjestus (Heinaru 2012).

Seleksioon – kindlates keskkonnatingimustes jäävad ellu ja annavad järglasi vaid need organismid, kes kannavad soodsaid geene ja genotüüpi (Heinaru 2012).

Transkriptsioon – RNA moodustumise protsess DNA-maatriksilt. Ensüüm RNA polümeraas katalüüsib RNA moodustumist ribonukleosiidtrifosfaatidest (Heinaru 2012).

Transport-RNA – (tRNA) on RNA-d, mis transpordivad aminohappeid ribosoomi, kus nad assambleeritakse polüpeptiidahelasse (Heinaru 2012).

Variatsioon – ehk muutlikkus on indiviidide erinevused populatsioonides (Heinaru 2012).

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Säga bioloogia

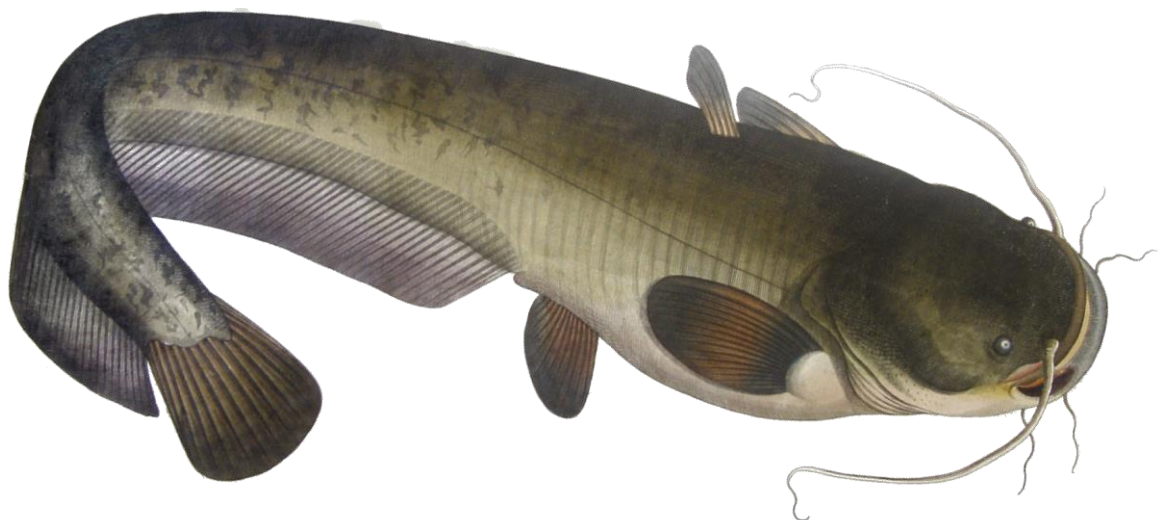
1.1.1. Säga süstemaatiline kuuluvus

Säga (*Silurus glanis* L.) kuulub luukalade (*Osteichthyes*) ülemklassi, kiiruimsete (*Actinopterygii*) klassi, sägaliste (*Siluriformes*) seltsi, sägalaste (*Siluridae*) sugukonda ja säga (*Silurus*) perekonda. Sägaliste seltsis on kokku 36 sugukonda ning üle 3000 liigi. (Ferraris 2007)

Peale Euroopa leiab sugukonna sägalased looduslikke populatsioone veel Aasiast ja Aafrikast (Copp *et al.* 2009). Säga on laia levialaga, kuid Euroopa ihtüofaunasse kuulub ainult kaks põlist säga perekonna liiki: säga ja aristotelese säga (*Silurus arlotelis*), kellest viimane on endemne liik Kreekas (Triantafyllidis *et al.* 1999a, 1999b).

1.1.2. Kirjeldus ja iseloomulikud tunnused

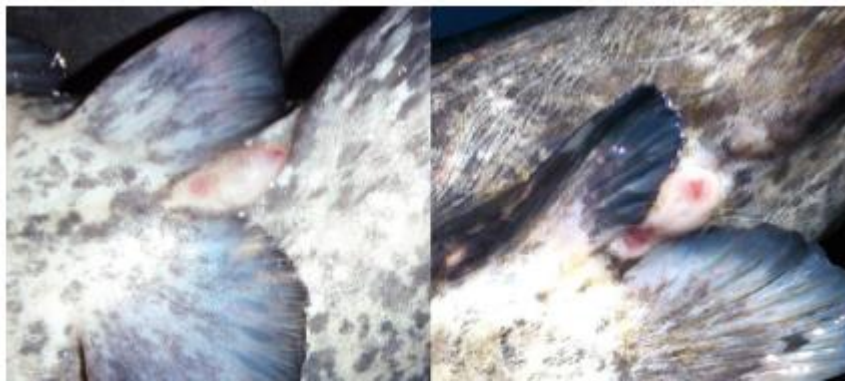
Säga pea on lai ja lame, tagakeha külgedelt sabauime suunas lamendunud (joonis 1). Selja eesosas on väike seljauim ning kõhuuimed ulatuvad kalal pärakuuimeni, mis on pikk ja puutub kokku ümardunud sabauimega. Rinnauimedel on tugev luuosa ning rasvauim puudub. (Mikelsaar 1984)



Joonis 1. Säga (AnimalBase).

Säga silmad on väikesed ning suu on suur ja selle kummaski otsas kinnitub ülahuulele üks pikk poise, mille liikumist saab kala kontrollida. Alalõual on sägal kaks paari lühikesi mitteliikuvaid poiseid (Triantafyllidis *et al.* 1999a). Säga nahk on soomusteta, paks ja limane ning küljejoon on kalal selgesti nähtav ja sirge (Mikelsaar 1984). Värvuselt on säga selg tumepruun, sinakas või rohekas, küljed on heledamad marmormustriga ning kõht valge (Ojaveer *et al.* 2003) või hallikirjaline (joonis 1) (Pihu, Turovski 2001).

Säga on Euroopa suurim magevee pärisluukala (Miller, Loates 1997), kes võib looduslikes tingimustes elada kuni 80-aastaseks (Mohr 1957), kuid liigi keskmine eluiga on 15–30 aastat (Alp, Kara 2004; Froese, Pauly 2012). Säga keskmine kaal on 45 kg ja enamike isendite täispikkus jääb 1,3–1,6 m vahele (Slone 2006). Tavaliselt on enamiku kalade isased aeglasema kasvuga, kuid säga puhul on vastupidi: isased kasvavad emastest kiiremini ja suuremaks (Pihu 2006), nende pea on kandilisem ja nahavärv tumedam (Coche, Edwards 1989). Emastel on rinnauime esimene kiir peenem, väiksema hammastusega, isasel jämedam, tugevama hammastusega (Pihu 2006). Lisaks on emastel genitaalpapill suur (joonis 2), lai ja punnis, sageli punase tipuga, aga isastel pigem terav ja lame (Coche, Edwards 1989).

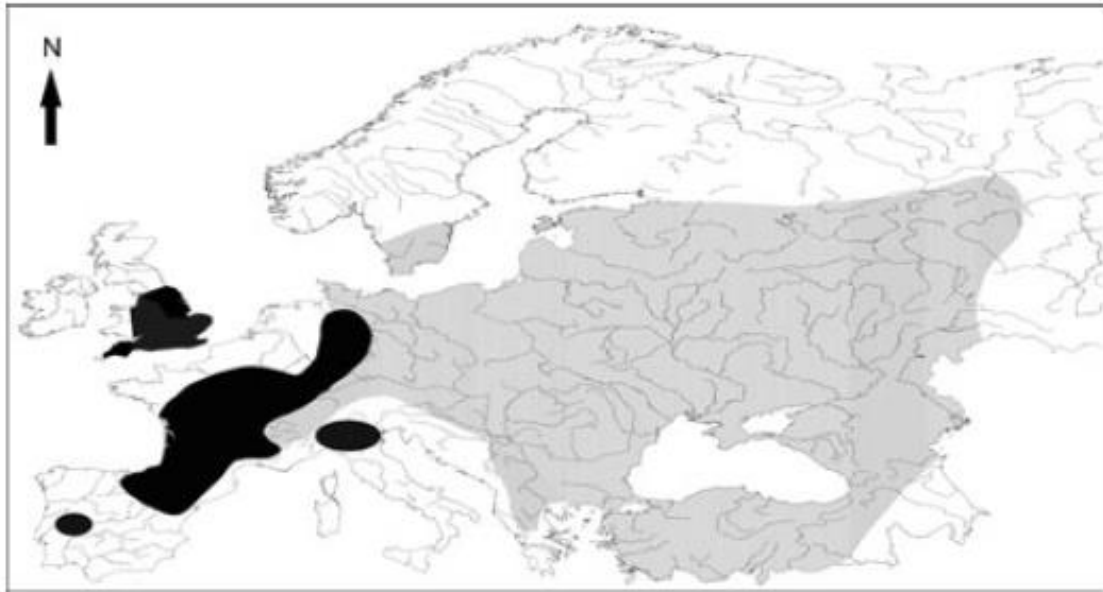


Joonis 2. Säga sooline eristamine, vasakul isane ja paremal emane säga (Vinterstare 2017).

1.1.3. Levik ja elupaik

Säga asustab põliselt Ida-Euroopat ja Lääne-Aasiat (joonis 3; Kinzelbach 1992). Euroopas on ta levinud selle ida- ja keskosas. Loodusliku levila läänepiir on Reini jõgi, lõunapiir Egeuse, Musta, Kaspia ja Araali mere jõgikonnad, põhjapiir on Läänemere, sealhulgas Skandinaavia, Laadoga, Onega, Ilmeni järvede jõgikonnad. Populatsioonid, mis ei kuulu nendesse piiridesse on inimese tekitatud (Krieg *et al.* 2000). Säga on asustatud 1857.

aastal Prantsusmaal ja Šveitsis asuvasse Rhone'i jõkke ja 19. sajandi teisel poolel Briti saarele. Nüüdseks on säga laialdaselt asustatud Euroopasse ja Balkaši (Kasahstan) järve ümbritsevatesse jõgikondadesse ja sellega seoses on levila laienenud (Freyhof, Kottelat 2008). Peamiseks säga asustamise põhjuseks on tema populaarsus harrastuskalastajate hulgas (Kucinski, Fopp-Bayat 2015).



Joonis 3. Säga levila. Halliga on tähistatud säga looduslikud ning mustaga levila laienemisel tekkinud populatsioonid (Copp *et al.* 2009).

Arvatakse, et säga on pärit Musta ja Kaspia mere basseinist (Ojaveer 2014) ning asustas Eesti ja Lõuna-Skandinaavia suhteliselt soojal ajaperioodil umbes 8000–5000 aastat tagasi (Pihu, Turovski 2001). Praegusel ajal toimuvad jõgede reguleerimised, ülepüük ja jõgede reostumine on säga populatsioonid langusesse viinud. Säga levila põhjapiiriks on Eesti (Pihu, Turovski 2001), sest Soomes on see liik tõenäoliselt välja surnud, kuna viimased andmed pärinevad 1960-ndatest (Koli 1990). Rootsis on säga levinud kuni 60 laiuskraadini, samas kui Lätis on ta haruldane (Ojaveer *et al.* 2003). Eestis on säga levinud Peipsi ja Pihkva järve vesikonnas ning vähesel määral rannikumeres (Mikelsaar 1984; Hunt 2012). Ennustatav veetemperatuuri tõus 2–3 °C 2050. aastaks loob sägale võimalusi oma leviala põhja poole laiendada (Rahel, Olden 2008; Britton *et al.* 2010).

Eestis on teateid säga püügist 1935-ndast aastast, kui Peipsi järvest püüti 10 ts ja Pihkva järvest 2 ts (1ts=100 kg) (Mikelsaar 1984). Säga on Eesti rannikumeres püügivahenditesse sattunud veel mitmel korral, nii 1989. a Väinameres, 1991. a Pärnu lahes, 2011. a

Rannaküla rannikumeres, kui ka Matsalu lahes ja Kasari jões (Hunt 2012). Viimaste aastate säga leiud piirduvad Emajõe alamjooksu, Peipsi-Pihkva järve, Võrtsjärve ja Ahja jõega (Hunt 2012). Oma bakalaureuse- ja magistritöö jaoks oleme Eesti päritolu säga koeproove 2015. ja 2016. aastal saanud kutseliste kalurite abil peamiselt Peipsi järvest, Lämmijärve Mehikoorma piirkonnast ning Emajõest, mis kinnitab, et säga neis veekogudes leidub.

Säga elupaigaks on tavaliselt sügava, aeglasevoolulise jõe taimedega kaetud pehmepõhjaline osa, vähese vee liikumisega jõelookmed ja järved ning kuni 15‰ soolsusega riimveed (Ojaveer *et al.* 2003; Copp *et al.* 2009). Tegemist on liigiga, kes talub madalat vee hapnikusisaldust (Pihu 2006), kuna tema veri sisaldab vaid 30–35% hemoglobiini, olles võimeline kasutama väikest hapnikusisaldust (kuni 1,3 mg/l) väga efektiivselt (Mihalik 1995). Selle tõttu talub säga suhteliselt hästi ka veekogude eutrofeerumist (Copp *et al.* 2009). Säga puhul on tegemist elupaigatruu kalaliigiga, mis tähendab, et oma biotoobis liigutakse ringi suhteliselt väikesel alal (Breve *et al.* 2014). Päevasel ajal on varjulise eluviisiga, peites end veekogude litoraalias (Abdullayev *et al.* 1978; Bruton 1996; Carol *et al.* 2007a, 2007b) veetaimede või vette langenud puutüvede vahele (Vida, Kotai 2011). Öisel ajal peab aga jahti (Ojaveer *et al.* 2003) ning talve veedab ta uinakus (Pihu, Turovski 2001), olles jõgede sügavates aukudes, koobastes või lõhedes; järvedes lebab ta nende sügavamates osades või pehmel mudal (Lelek *et al.* 1964; Lelek 1987).

1.2. Looduslike sägapopulatsioonide seisund Euroopas

Rahvusvahelise looduskaitseliidu (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* – IUCN) andmetel kuulub säga kõige madalamasse ohustatuse kategooriasse (*least concern*). Liik on oma levila piires laialt levinud, kuid viimastel aastatel on Euroopas populatsiooni suurused vähenenud (Draszkiewicz-Mioduszevska *et al.* 2014). Ohtudeks peetakse jõgede reguleerumisest tingitud madalate kudemispaikade kadumist (Freyhof, Kottelat 2008), ülepüüki ja veekogude reostumist (Kucinski, Fopp-Bayat 2015). Soojemates paikades on tõenäoliselt ohuks ka kasvandustest loodusesse pääsenud isendid, kes võivad negatiivselt mõjutada looduslike sägapopulatsioonide geneetilist mitmekesisust, kuid seda on veel vähe uuritud (Elvira 2001; Britton, Pegg 2007).

Eestis on säga looduskaitse all, kuuludes II kaitsekategooriasse ja Punase Raamatu ohustatud liikide nimistusse (Eesti Punane... 2008). Seda eelkõige seetõttu, et Eestis ei küündi veetemperatuurid igal aastal säga kudemiseks optimaalsele tasemele, päädides puuduliku järelkasvuga, millest tingituna on säga seisund halb (Ojaveer *et al.* 2003). Sellepärast puudub sägal Eestis töenduslik ja sportlik tähtsus ning tema püük on aasta ringi keelatud (Pihu 2006).

1.2.1. Looduslike populatsioonide täiendamine

„Eesti kalakasvatuseliku taastootmise tegevuskava 2017–2019“ alusel kuulub säga prioriteetsus-klassi number III. Viimasesse kuuluvad kaitsealused liigid, kelle vastu võib tekkida püügihuvi, kuid taastootmine vajab eeluuringuid, sest võimalused, kuidas populatsiooni püügiks piisavale tasemele tõsta, vajavad selgitamist. Säga puhul oleks asustamise esmane eesmärk teha eeluuring populatsiooni taastamise kohta ning säilitada liiki. Tegevuskavas on öeldud, et asustavate kalade optimaalne maht aastas oleks 100 000 samasuvist säga ning asustamise piirkonnad Emajõgi, Peipsi- ja Lämmijärv, Võrtsjärv, Pärnu ja Kasari jõgi. (Baikov *et al.* 2017)

Säga looduslikke populatsioone on täiendatud näiteks Poolas, kus 1996. aastal lasti erinevatesse veekogudesse lahti 16 tonni säga (Fisheries administration... 1999). Nüüdisajal lastakse Poola kalastajate assotsiatsiooni (PZW – *Polish Anglers Association*) ja teiste volitatud asutuste poolt igal aastal veekogudesse hinnanguliselt 600 000 vastset ja 50 tonni vanemaid isendeid. (Mickiewicz *et al.* 2014)

Looduslikke populatsioone on täiendatud ka Rootsis (Palm *et al.* 2008; Jansson 2012; Vinterstare 2017). Säga kuulub seal Punase Raamatu kategooriasse „ohualdis“, mis tähendab, et tema püük on keelatud. Looduslikud populatsioonid on praeguseks säilinud ainult riigi kaguosas kolmes erinevas veekogus: Båveni järves, Emåni järves ning Helgeå jõe ülem- ja alamjooksul (Vinterstare 2017). Enne 2000ndat aastat on Helgeå jõe alamjooksule lastud teistest Rootsi veekogudest pärinevaid suguküpsid sägasid. Populatsiooni täiendamise eesmärgiks oli luua kõrge geneetiline varieeruvusega populatsioon. Hilisemate uuringute (Jansson 2012; Vinterstare 2017) tulemused kinnitasid seda, kuid nende isendite arv, kes vastutavad populatsiooni järelkasvu eest (populatsiooni efektiivne suurus – N_e) oli väga madal. Lisaks saadi uurimistööga teada, et Helgeå jõgi on sägadele soodne elupaik, kus kasv on kiire ja suguküpsus saabub varakult. Uuringu

tulemused näitasid, et antud meetod (kasutada populatsioonide täiendamiseks lähipiirkonna populatsioonide isendeid) sobib hästi elujõulise populatsiooni saavutamiseks ning seda võiks kasutada mujalgi (Jansson 2012). Sägapopulatsioonide seisundi jätkuvaks parendamiseks on Rootsis loodud tegevuskava aastateks 2017–2022 (Vinterstare 2017).

1.3. Ülevaade säga kasvatamisest Euroopas ja Eestis

Säga on Euroopa ida- ja keskosas ekstensiivmeetodil kasvatatud koos karpkalalastega juba rohkem kui 100 aastat. Koguproduktiooni moodustavad Euroopas 11 riigi (Austria, Bulgaaria, Horvaatia, Saksamaa, Prantsusmaa, Ungari, Kreeka, Makedoonia, Poola, Tšehhi ja Rumeenia) kalakasvandused, mille toodang on kogu aeg kasvanud (kui 1993. aastal oli 602 tonni, siis praegu umbes 2000 tonni). Enamasti kasvatatakse säga tiikides või geotermaal-/soojendatud vetes. Säga liha eelistatakse, sest see on luudeta, valge, madala rasvasisaldusega (6–8%) ning seda on kerge valmistada. (Linhart *et al.* 2002)

Säga kasvatatakse Eestis üksikutes kalakasvandustes, nagu näiteks Lapavira OÜ, Narva Störfisch OÜ, Karilatsi Kalamajandis ja Kalatalu Härjanurmes. Hetkel on liigi kasvatamine piirdunud mujalt riikidest, näiteks Leedust ja Lätist, vastsete sisse toomisega. Vastsete tootmisega meil ei tegeleta, kuigi selle vastu on suur huvi. Kõigis eespool mainitud kalakasvandustes ei ole spetsialiseerunud sägakasvatusele ning liiki turustatakse vaid põhitoodangu kõrvalproduktina (v.a Karilatsi Kalamajand).

Säga efektiivseks kasvatamiseks on vaja piisavalt sooja vee olemasolu, kuna optimaalne kasv, paljunemine ja toitainete omastamine toimub suhteliselt kõrgetel veetemperatuuridel (25–28 °C) (Copp *et al.* 2009). Eestis tähendaks see kasvatamist peamiselt korduva veekasutusega süsteemis, sest tiikides jääb veetemperatuur säga jaoks enamasti liiga madalaks või on optimaalne ainult väga lühikese ajaperioodi vältel. 2017. aastal sai Eesti Maaülikooli vesiviljeluse õppetool Euroopa Merendus- ja kalandusfondi meetmest 2.1 „Vesiviljeluse innovatsioonitoetus“ toetust projektile, millega töötatakse välja Eesti tingimustesse kõige sobivamad säga kasvatus- ja paljundamistehnoloogiad ning selgitatakse välja parimate omadustega liinid.

1.4. Säga geneetiline populatsioonistruktuur

1.4.1. Liigisisese geneetilise mitmekesisuse hindamise teoreetilised alused

Organismid osalevad lakkamatult mikro- ja makroevolutsioonilistes protsessides, nii molekulaarsel kui ka isendi tasemel. Evolutsioon algab molekulaarsel tasemel, täpsemalt mutatsioonidest DNA molekuli valke ja ensüüme kodeerivate lõikude ehk geenide nukleotiidses järjestuses, mille tulemusena koos keskkonnast tingitud mõjutustega kujunevad variatsioonid isendite fenotüübi tasemel. Isendid moodustavad liigisiseseid, reproduktiivselt üksteisest vähem või enam isoleeritud rühmitusi (populatsioone või karju), mis on evolutsiooni fundamentaalseteks ühikuteks. (Abdul-Muneer 2014)

Geneetilise mitmekesisuse (varieeruvuse) hindamine populatsioonide siseselt ja nende vahel on bioloogiliste ressursside haldamisel väga oluline. Variatsiooni ehk isendite vahelisi geneetilisi erinevusi populatsioonides mõjutavad selektsioon, mutatsioonid, sigivate isendite arvust sõltuv juhuslik geenitriiv, migratsioon ja elustrateegia tüüp ning samuti paarumistüüp (Beaumont *et al.* 2010). Suurema geneetilise mitmekesisusega populatsioonid on keskkonnamõjutustele vastupidavamad ja taastuvad häiringutest kiiremini (Beardmore *et al.* 1997). Liikide tegevuskavades pööratakse suurt rõhku geneetilise variatsiooni säilitamisele, sest selle tõttu on võimalik liikide jätkuv evolutsioneerumine ja kasvatatavatel liikidel tõuaretus (Singh *et al.* 2011).

Üheks evolutsiooniprotsessi osaks on liikide diferentseerumine geneetiliselt erinevateks populatsioonideks, seda põhjustavad füüsikalised ja bioloogilised tegurid, mille käigus võivad liigid killustuda. Näiteks viimase jääaja tõttu taganesid paljud parasvöötme ja põhjapoolkera liigid lõunasse jääaja pelgupaikadesse ehk refuugiumitesse, kust hiljem, pärast jääaja lõppu, algas elupaikade taasisustamine ja populatsioonide diferentseerumine. Viimase tõttu võib juhusliku geenitriivi tulemusena geneetiline (alleelne) mitmekesisus väheneda ning seda eriti siis, kui populatsiooni moodustavad ainult vähesed isendid. Erinevate alleelivariantide olemasolu populatsioonis on aga oluline, sest see on oluline osa populatsiooni geneetilisest ressursist. Alleel üksi või kombineerituna teiste alleelide või lookustega võib olla populatsioonile olulise tunnuse kandja, näiteks suurem vastupanuvõime mõnele kindlale haigusele, parem külmataluvus või kiirem kasv. Lisaks geenitriivile võib populatsioonidevahelisi erinevusi põhjustada kindlate piirkondade keskkonnaoludega kohanemine ehk adapteerumine. (Beaumont *et al.* 2010)

1.4.2. Geneetilised markerid

DNA ehk desoksüribonukleiinhape on polümeer, mis kannab geneetilist informatsiooni. See on makromolekul, mis koosneb kahest pikast komplementaarsest desoksüribonukleotiidi ahelast, kus monomeerid on üksteisega seotud fosfodiesteridemetega (Heinaru 2012). DNAd leidub loomadel rakutuumas ja mitokondrites (mtDNA). Tuuma DNA paikneb rakutuumas asuvates kromosoomides diploidsetel (kahe kromosoomikomplektiga) liikidel kahe koopiana (Beaumont *et al.* 2010), kusjuures üks koopia pärineb emalt ja teine isalt. MtDNA on rõngakujuline molekul ning pärineb tavaliselt ainult emalt (Robinson 2010) Viimast põhjustab asjaolu, et pärast viljastumist hävitab munarakk spermide mitokondrid. Lisaks sellele paiknevad mitokondrid tavaliselt spermi sabaosas, mida kasutatakse liikumapaneva jõu tekitamiseks ning tihti ei jõua spermi saba viljastamisel munarakku (Allendorf, Luikart 2007). On leitud, et mtDNAs toimuvad evolutsiooniks vajalikud mutatsioonid 5–10 korda kiiremini kui tuuma DNAs ja seetõttu on mtDNA kasulik hiljutiste evolutsiooniliste muutuste uurimiseks (Beaumont *et al.* 2010)

Populatsioonide geneetilise mitmekesisuse hindamiseks kasutatakse geneetilisi markereid, milleks on geenid või mingid muud DNA lõigud, millel on kergesti identifitseeritav fenotüüp ja mille pärandumist on võimalik kindlaks teha immunoloogiliste (veregruppide polümorfism), biokeemiliste (valkude ja ensüümide ehk allosüümide polümorfism) või molekulaargeneetiliste (DNA polümorfism) meetodite abil (Beaumont *et al.* 2010). DNA markereid saab jagada vastavalt nende päritavusele ja evolutsioonidünaamikale kahte klassi: rakutuuma DNA ja mitokondriaalse DNA (mtDNA) markerid. Rakutuuma DNA markerid päritakse mõlemalt vanemalt, mtDNA markerid päritakse tavaliselt emalt. MtDNA efektiivse populatsiooni suurus (N_e) moodustab $\frac{1}{4}$ tuuma markerite omast (Abdul-Muneer 2014). Viimane teeb mtDNA markerid eriti tundlikuks rajajaefekti ja populatsiooni pudelikaela efektist tingitud geneetilise variatsiooni vähenemise hindamisel. Samuti säilib mtDNAs rakutuuma DNAST kauem info populatsioonide isolatsiooniseisundite kohta (Billington, Hebert 1991).

Eristatakse järgmisi DNA markerite tüüpe: VNTR (ingl. *variable number tandem repeats*) ehk varieeruva arvuga tandemkordused; SNP (ingl. *single nucleotide polymorphisms*) ehk üksiknukleotiidide polümorfismid; RAPD (ingl. *random amplified polymorphic DNA*) ehk juhuslikult amplifitseeritud polümorfne DNA; AFLP (ingl. *amplified fragment length*

polymorphism) ehk amplifitseeritud fragmentide pikkuspolümorfism; DNA nn. sõrmejäljemeetod (ingl. *DNA fingerprinting*) ja RFLP (ingl. *restriction fragment length polymorphism*) ehk restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism (Heinaru 2012; Beaumont *et al.* 2010). Lisaks kasutatakse geneetilise mitmekesisuse hindamiseks ja fülogeneesi rekonstrueerimiseks DNA (peamiselt geenide) nukleotiidseid järjestusi (Beaumont *et al.* 2010).

1.4.2.1. DNA nukleotiidsed järjestused varieeruvad

Geneetilised erinevused DNA järjestustes tekivad mutatsioonide tõttu. Rakk kopeerib DNAd jagunemise ehk replikatsiooniprotsessi käigus ning vahel tekivad selle käigus vead, mida nimetataksegi mutatsioonideks. Kõige tavalisem mutatsioon on see, kui toimub nukleotiidide järjestuse muudatus, nt üks aluspaar asendatakse teisega (SNP), kustutatakse (deletsioon) ja/või lisatakse (insertsioon). Valdavalt sellised vead parandatakse, kuid iga rakujagunemisega mõni neist säilib. Enamasti tekivad mutatsioonid, mis ei ole halvad ega head ehk on loodusliku või kunstliku valiku seisukohalt neutraalsed, need lihtsalt põhjustavad erinevusi DNA ahelas. Aga kui variatsioon esineb sellises genoomi piirkonnas, mis kodeerib valke ja ensüüme, mõjutab seda, millal ja millistes rakutüüpides on valgud ja ensüümid aktiivsed ja kui palju neid toodetakse. Järglastele pärandatakse edasi vaid sellised mutatsioonid, mis tekivad sugurakkudes. Mutatsioonide tekkepõhjuseid on mitmeid: radiatsioon, kemikaalid, radikaalid, UV kiirgus jne. (Genetic science... 2016)

MtDNA järjestuste abil saab hinnata erinevate haplotüüpide arvu ja sagedust populatsioonides. Haplotüüp on tihedalt aheldunud geneetiliste elementide järjestus kromosoomis, mis pärandub ühtse üksusena. Nendest moodustuvad haplotüübiplokid on suhteliselt muutumatud, sest neis piirkondades ei toimu rekombinatsiooni või see toimub suhteliselt harva (Heinaru 2012). MtDNAd võib samuti käsitleda ühe haplotüübina, sest selles paiknevad geenid on omavahel füüsiliselt aheldunud ja päranduvad ühtse üksusena. Võrreldes saadud haplotüüpide geneetilisi seoseid ja nende esinemissagedust, saab teha järeldusi populatsioonide geneetilise struktuuri kohta (Beaumont *et al.* 2010; Krieg *et al.* 2000). Samuti saab hinnata haplotüüpide (h) ja nukleotiidide (π) diversiteeti populatsioonides. Haplotüüpide diversiteet on seejuures analoogne heterosügootsusega, mida kasutatakse valkude või mikrosatelliitide polümorfismi hindamisel (Nei 1987). Lisaks saab mõõta geneetilist distantssi ehk divergeerumist nii haplotüüpide kui populatsioonide vahel ning koostada nii haplotüüpide kui populatsioonide geneetilise

sugupuu, mis näitab liikide ja populatsioonide fülogeneetilist sugulust (Nei 1987; Heinaru 2012; Abdul-Muneer 2014).

1.4.2.2. DNA fragmentide pikkustel põhinevad geneetilised markerid

Järgnevalt käsitletakse kahte käesoleva magistritöö seisukohalt olulisemat DNA fragmentide pikkuspolümorfismil põhinevat geneetilist markerit.

1.4.2.2.1. Varieeruva arvuga tandemkordused (VNTR)

VNTR hulka kuuluvad markerid on mikro- ja minisatelliidid, nendega saab tuvastada indiviide, liike ja populatsioone ning samuti ka populatsioonis hiljuti toimunud geneetilisi muutusi. Mikrosatelliitmarkerid on tandeemselt korduvad lühikesed ja lihtsad 1–6 aluspaari (bp) pikkused nukleotiidikordused, mille puhul varieerub nende korduste arv. (Hoelzel 1998)

Tänapäeval kasutatakse mikrosatelliitmarkereid väga ulatuslikult ning sellel on mitmeid põhjuseid. Nendes toimuvad muudatused kiiremini kui mtDNAs ja allosüümides ja seetõttu näitavad mikrosatelliitmarkerid palju paremini populatsioonidevahelisi geneetilisi erinevusi (diferentseerumist). Need on kodominantsed ning see tähendab, et nendega saab tuvastada nii homo- kui ka heterosügootseid genotüüpe (mõlemaid allele saab tuvastada) ja tänu sellele saab neid analüüsida standardse Hardy-Weinbergi mudeliga (saab analüüsida mikrosatelliitide genotüüpi ja alleelset informatsiooni). Kuna mikrosatelliite esineb kodeerivas DNAs vähe, siis saab neid pidada selektiivselt neutraalseks. Mikrosatelliidilookuste genotüpiseerimiseks saab kasutada automaatseid DNA sekvenaatoreid, mis kiirendab oluliselt proovide analüüsimise protsessi. (Beaumont *et al.* 2010)

Mikrosatelliidid on laialt kasutuses erinevate liikide geneetilistes uuringutes, kuid nende rakendamine eeldab informatsiooni olemasolu konkreetse liigi genoomi nukleotiidse järjestuse kohta, et välja töötada liigispetsiifilised polümeraasiahelreaktsiooni (PCR ingl. *Polymerase chain reaction*) praimerid, mis piiravad tandeemseid 1–6 bp nukleotiidikorduseid sisaldavaid DNA piirkondi. (Beaumont *et al.* 2010)

Mikrosatelliitide lookused on populaarsemad markerid populatsioonidünaamika, demograafiliste pudelikaelade, populatsioonisuuruse muutumise ja efektiivse populatsiooni suuruse uurimisel. Populatsioonide geneetilise variatsiooni hindamiseks

kasutatakse mikrosatelliitmarkerite puhul polümorfsete lookuste osakaalu, privaatalleelide (esinevaid vaid ühes populatsioonis) arvu, keskmist alleelide arvu lookuse kohta ning tegelikku ja oodatavat heterosügootsust (Triantafyllidis *et al.* 2002). Juhul kui tegelikult heterosügootsuses ja alleelide arvukuses toimub järsk vähenemine, võib see viidata pudelikaela läbinud populatsioonile (Singh *et al.* 2011). Mikrosatelliitmarkerite abil saab hinnata ka populatsioonide struktuuri, s.t, kas populatsioon on ühtne või koosneb mitmest alampopulatsioonidest. Populatsioonide vahelist diferentseerumise taset saab hinnata alleelisageduste põhjal arvutatud F_{ST} indeksi abil. Mikrosatelliidilookuste alleelisageduste geograafilise leviku uurimisega saab tuvastada ka lokaalse adaptatsiooniga populatsioone (Singh *et al.* 2011). Tegelikult ja oodatava heterosügootsuse analüüsi abil saab hinnata genotüüpide jaotuse vastavust Hardy-Weinbergi (H-W) tasakaalule ja hinnata inbriidingu (F_{IS}) taset. Samuti saab arvutada populatsioonide vahelisi geneetilisi distantse ja koostada nende põhjal populatsioonide dendrogramme (Beaumont *et al.* 2010).

1.4.2.2.2. Restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism (RFLP)

RFLP puhul on tegemist kiire ja odava DNA järjestuse variatsiooni määramise meetodiga. Esiteks paljundatakse uuritavat lõiku PCR meetodiga ja seejärel lõigatakse saadud produkti erinevate restriksiooniensüümidega, mis tunnevad ära spetsiifilise nukleotiidide järjestuse ja lõikavad seda kindlast kohast. Järgnevalt jooksutatakse saadud DNA fragmente nende mustri ja pikkuse määramiseks agarosgeelelektroforeesil ning etiidiumbromiidiga märgistatud fragmendid visualiseeritakse ja dokumenteeritakse ultravioletse lainepikkusega valgusallikat kasutades. Negatiivne on see, et restriksiooniensüümidega ei ole võimalik määrata uuritava DNA fragmendi täielikku nukleotiidide järjestust ja seega jäävad osad variatsioonid avastamata. (Beaumont *et al.* 2010)

Selline meetod on sobiv mtDNA jaoks, sest viimane on üsna lühike molekul (ca 16 kb) ning seda saab isenditelt eraldada suures koguses. Konkreetse restriksiooniensüümiga lõigates saadud uuritava DNA piirkonna erinevad fragmendimustrid tähistatakse erinevate tähtedega ja ühe isendi sama DNA piirkonna lõikamisel erinevate restriksiooniensüümidega saadud mustrite tähistused kombineeritakse mtDNA puhul nn komposiithaplotüübiks. (Beaumont *et al.* 2010)

Sarnaselt mtDNA nukleotiidsete järjestusega saab ka RFLP markerite abil hinnata erinevate komposiithaplotüüpide arvu ja sagedust populatsioonides. Samuti saab hinnata haplotüüpide (h) ja nukleotiidide (π) diversiteeti populatsioonides ning mõõta geneetilist distantssi ehk divergeerumist nii haplotüüpide kui populatsioonide vahel ja koostada selle põhjal nii haplotüüpide kui populatsioonide geneetilise erinevuse või sarnasuse dendrogrammi, mis näitab evolutsioonilist sugulust. (Nei 1987; Heinaru 2012)

1.4.3. Säga mtDNA genoom

Säga mtDNA genoom (joonis 4) koosneb 16 526 aluspaarist ning sisaldab kontrollregiooni (D-ling, ingl. *D-loop*) ja 37 geeni, millest 13 kodeerivad valke, 2 ribosomaalset RNAd (rRNA) ja 22 transpordi RNAd (tRNA) (Vittas *et al.* 2011). Säga mtDNA geenide järjekord on identne teiste kalade (Miya *et al.* 2003) ja kõrgemate selgroogsetega (Boore 1999).

D-ling ehk inglise keeles *D-loop* on tuletatud sõnast *displacement loop*, sageli kutsutakse seda ka kontrollregiooniks, sest see kontrollib mitokondriaalsete geenide transkriptsiooni ja replikatsiooni. MtDNAs toimuvad evolutsiooniprotsessid 10 korda kiiremini kui rakutuuma geene kodeerivas DNAs ja D-ling on kõige varieeruvam mtDNA regioon (Yamamoto 2001). D-lingus toimuvad intensiivselt üksiknukleotiidide asendused ja genoomis toimuvad muudatused akumulatuuruvad selles piirkonnas, mis teeb D-lingu eriti sobilikuks populatsioonide geneetilise variatsiooni hindamiseks (Meyer 1994). Uuringuteks kasutatava regiooni valik on oluline, sest mtDNA regioonides on erinevad mutatsioonisagedused ning sekveneeritavast piirkonnast ja analüüsitavatest aluspaaride hulgast oleneb otseselt võimekus määrata polümorfsust. Seejuures tuleb silmas pidada, et antud regiooni nukleotiidsete järjestuste analüüs on alati informatiivsem kui sama regiooni restriksiooniensüümide analüüs ehk ei saa otseselt võrrelda kiiresti evolutsioneeruva regiooni (näiteks kontrollregioon) sekveneerimisel saadud informatsiooni RFLP meetodil saadud informatsiooniga (Ferguson, Danzmann 1998).

populatsioonide geneetilist mitmekesisust, tegid Krieg *et al.* (1999) uuringu mikrosatelliitmarkeritega ning leidsid, et need on head vahendid eespool toodud tegurite hindamiseks, sest nendega saab täpsemini hinnata populatsioonide geneetilist struktuuri. Järgnevalt uuriti mikrosatelliitide abil säga liigi levila koguulatuses (v.a. Läänemere vesikonna populatsioonid), et mõista säga geneetilist populatsioonistruktuuri ja evolutsioneerumist (Triantafyllidis *et al.* 2002). Leiti, et Volga ja Doonau jõgedes on populatsioonide keskmine heterosügootsus kõrge, mis võib olla tingitud asjaolust, et need jõed on proovikogumispiirkondade suurimad ning seetõttu on nende populatsioonides isendeid rohkem kui teistes, väiksemates veekogudes. Teine hüpotees on see, et kuna proovid on kogutud jõe deltast, võivad isendeid pärineda mitmest erinevast lisajõest. Kreeka ja Türgi populatsioonid leiti olevat madalama heterosügootsusega ning Pineiose jões (Kreeka) ja Morati järves (Šveits) puudus polümorfism täielikult (Triantafyllidis *et al.* 2002). Kreeka populatsioonide madalat geneetilist variatsiooni põhjendati samade faktidega, mis on toodud välja Triantafyllidis *et al.* (1999b) allosüümidega tehtud töös, kuid samas võib siin määravaks osutuda fakt, et Kreeka on säga levila lõunapiiriks. Šveitsi sägapopulatsiooni polümorfismi vaeguse põhjused on, et seal on liik oma levila läänepiiril ja ilmselt on seal olnud tegemist rajajaefektiga ehk suuremast populatsioonist on sinna rännanud väike isendite grupp, mille tõttu on suur osa geneetilist mitmekesisust kaotsi läinud. Kalakasvanduste karjade isendid, kes on pärit Doonau ja Elbe jõest, analüüsid tuvastasid mõõdukat ja kõrget heterosügootsust. Samas nenditi fakti, et kõik säga populatsioonid on alguse saanud ühest Ponto-Kaspia regiooni refuugiumist ning on sealt levinud üle Euroopa (Triantafyllidis *et al.* 2002).

Rootsis on säga populatsioone mikrosatelliitmarkeritega uurinud Palm *et al.* (2008). Uuriti 1982.–2007. aastatel Båveni, Emåni ja Möckelni veekogudest püütud 320 säga. Leiti, et Emånis on tegemist kahe erineva populatsiooniga ning sellise struktureerituse on põhjustanud looduslik tõke (kõrge juga), mis takistab migratsiooni ülesvoolu. Samas kui Båveni järve alampopulatsioonide kohta järelduste tegemiseks oli isendite arv liiga väike, oli Möckelnil jõgede ja järvede süsteemis eristunud alampopulatsioone kolm: Agunnarydsån, Lilla Helgeå ja Helgeå. Üldiselt saab öelda, et võrreldes teiste Euroopa populatsioonidega on Rootis sägapopulatsioonide geneetiline variatsioon ja efektiivne suurus väike.

Kalapopulatsioone saab üleekspluateerimise eest kaitsta püügi reguleerimise, elukeskkonna kaitse, parandamise või taastamisega ning kalakasvatustliku taastootmise abil (Baikov *et al.* 2017). Viimast on tehtud Rootsis, kuid erisusega, et populatsioonide täiendamiseks võetud isendid on saadud teistest looduslikest populatsioonidest. Hiljem on säga populatsioonide täiendamise edukust Rootsi Helgeå jões uurinud Jansson (2012). Uurimistööga taheti teada, kas enne sajandivahetust jõkke lastud sägade populatsioon on taastunud, sest arvati, et liik on jõest kadunud. Täpsemalt uuriti mikrosatelliitmarkeritega, N_e -d, geneetilist variatsiooni ja isendite inbriidsust. 78 säga analüüsimisel leiti, et esineb suhteliselt kõrge geneetiline varieeruvus, mis võib olla tingitud mitme populatsiooni isendite segunemisest, sest populatsiooni taastamiseks võeti täiskasvanud isendeid muudest Rootsi veekogudest. Samuti saadi teada, et populatsiooni efektiivne suurus on väike ja sellega seoses tuleks täiendavalt uurida vasttekkinud populatsiooni käekäiku. Leiti, et kasutatud asustamise meetod on hea ning selleks, et geneetiline mitmekesisus ei väheneks, tuleks populatsiooni isendite arvu veelgi suurendada.

Mikrosatelliitide abil on sägapopulatsioonide geneetilist mitmekesisust ja struktuuri uuritud ka Edela-Iraanis. Eesmärgiks oli välja selgitada populatsioonide sobivus vesiviljeluseks ja liigikaitse vajadus. Leiti, et Kaspia mere äärne Anzali laguuni populatsioon on madalama geneetilise mitmekesisusega kui teised, Mahabadi paisjärve, Zarinehi jõe ja Arasi jõe populatsioonid. Samuti on eespool toodud geograafiliste regioonide populatsioonide vahel suured erinevused geneetilises varieeruvuses (v.a Kaspia mere populatsioonid; Kamangar, Rostamzadeh 2015)

Esimene märge mtDNA kasutamise kohta sägapopulatsioonide uurimisel on pärit Triantafyllidis *et al.* (1999a) artiklist, kus uuriti kuute Kreeka ja ühte Doonau jõe populatsiooni. Leiti, et Kreeka populatsioonide siseselt on geneetiline mitmekesisus madal ja populatsioonide vaheline varieeruvus väga väike (Triantafyllidis *et al.* 1999a). Selliseid tulemusi põhjendati taaskord väidetega, mis on välja toodud Triantafyllidis *et al.* (1999b, 2002) allosüümide ja mikrosatelliitidega tehtud töödes. Krieg *et al.* (2000) mtDNA uurimus põhineb 13 loodusliku ja 8 kasvanduse säga populatsioonistruktuuri hindamisel, kattes suurt osa liigi levialast (v.a Läänemere piirkond). Saadi teada, et populatsioonidevaheliselt on mtDNA mitmekesisus suur, kuid nukleotiidide divergents populatsioonisiselt väike, samuti ei leitud kindlat geograafilist mustrit haplotüüpide jaotuses. Kahte viimast fakti saab seletada sellega, et alles hiljuti, jääaja ajal või peale

seda, oli populatsioonide vahel võimalik migratsioon ja geenivahetus, mis võisid takistada diferentseerumist (Bianco 1990; Economidis, Banarescu 1991). MtDNA on äärmiselt vastuvõtlik sellistele mõjutustele nagu geenitriiv, pudelikaela efekt ja rajajaefekt, mis peale jääaega liigi areaali laienedes on populatsioone mõjutanud (Birky *et al.* 1983). Nenditi fakti, et kodustatud sägakarjadel on madal geneetiline mitmekesisus, ehkki nad on pärit Doonau jõest ja et mõnes veekogus, näiteks Doonau ja Volga jões, on haplotüüpide varieeruvus suurem kui Kreekas (Krieg *et al.* 2000).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Materjal ja metoodika

2.1.1. Proovide kogumine

Uurimistöö materjal koguti aastatel 2015–2017 Peipsi järvest ja Emajõe alamjooksult ning neljast Eesti kalakasvandusest: Lapavira OÜ, OÜ Karilatsi Kalamajand, Kalatalu Härjanurmes ja Störfisch OÜ (tabel 1). Kõigilt isenditelt võeti koeproov kõhuuimest, mis säilitati 96% etanoolis. Kalakasvandustest koguti kokku 106 koeproovi ja Peipsi järvest saadi kutseliste kalurite abiga 14 loodusliku säga koeproovi. Seega koguti Eestis kokku 120 koeproovi, millest 116 kasutati mikrosatelliitmarkerite analüüsiks (Karilatsi kalamajandist saadud 4 säga andmeid ei kasutatud valimi väiksuse tõttu), kuid mtDNA analüüsiks kasutatud proovide arv oli väiksem (PCR-RFLP analüüsis 21 ja D-lingu sekveneerimisel 100) sõltuvalt proovide olemasolust vastava analüüsi teostamise hetkel (tabel 1). Kalakasvanduste omanike andmetel on Lapavira OÜ sägad toodud Leedu Riiklikust kalamajandist ning Störfisch OÜ ja Kalatalu Härjanurmes sägad olevat saadud Raivo Puuritsa kasvandusest, kes omakorda on Ain Järvalti andmetel sägad saanud Läti kalakasvandusest. Karilatsi Kalamajand OÜ sägade päritolu ei õnnestunud välja selgitada, aga tõenäoliselt on need samuti teiste Läänemeremaade päritolu. Lisaks kasutati mtDNA PCR-RFLP andmete võrdlevaks analüüsiks varem avaldatud andmeid teiste Euroopa piirkondade sägapopulatsioonide kohta (Krieg *et al.* 2000) ning mtDNA D-lingu järjestuste võrdlevaks analüüsiks säga mtDNA genoomi referentsjärjestust, mis on saadud Kreekas Kastoria järvest püütud isendi põhjal (GenBank NC_014261; Vittas *et al.* 2011).

Tabel 1. Uuritud looduslikud sägapopulatsioonid ja kasvanduste sägakarjad

Populatsioon/kari	Päritolumaa	Vesikond	Lühend	Staatus	Isendite arv			Alli- kas
					mtDNA RFLP	D-lingu järjestus	mikro- satelliidid	
Peipsi järv	Eesti	Läänemeri	PEIP	L	1	13	14	*
Störfisch OÜ	Läti	Läänemeri	STÖR	K	10	47	47	*
Lapavira OÜ	Leedu	Läänemeri	LAPA	K	6	6	25	*
Kalatalu Härjanurmes	Läti	Läänemeri	HAR	K		30	30	*
Karilatsi Kalamajand OÜ	teadmata	Läänemeri	KARI	K	4	4		*
Loire jõgi	Prantsusmaa	Atlandi ookean	LOI	L	28			**
Heyman	Prantsusmaa	Atlandi ookean	HEY	K	10			**
Clouzioux	Prantsusmaa	Atlandi ookean	CLOU	K	10			**
AEI	Prantsusmaa	Atlandi ookean	AEI	K	10			**
Volga Delta	Venemaa	Kaspia meri	VOLG	L	13			**
Arpa jõgi	Türgi	Kaspia meri	KARS	L	2			**
Sakarya jõgi	Türgi	Must meri	SAK	L	10			**
Puiu järv	Rumeenia	Must meri	DDN	L	32			**
Pruti jõgi	Rumeenia	Must meri	PRUT	L	5			**
Dyje jõgi	Tšehhi	Must meri	DYJE	L	17			**
Rusca	Rumeenia	Must meri	RUSC	K	9			**
Vodnany South Bohemian	Tšehhi	Must meri	SVOD	K	12			**
Vodnany Elbe	Tšehhi	Põhjameri	VOD	K	9			**
Vodnany Hodonine	Tšehhi	Must meri	HOD	K	7			**
Seyhani jõgi	Türgi	Vahemeri	SEYH	L	10			**
Strymoni jõgi	Kreeka	Vahemeri	STN	L	30			**
Pineiose jõgi	Kreeka	Vahemeri	PIN	L	30			**
Aliakmoni jõgi	Kreeka	Vahemeri	ALI	L	30			**
Evrose jõgi	Kreeka	Vahemeri	EVR	L	31			**
Axiose jõgi	Kreeka	Vahemeri	AXI	L	31			**
Strymon	Kreeka	Vahemeri	STH	L	5			**
Kastoria järv	Kreeka	Vahemeri	REF	L		1		***
Eesti sägapopulatsioonide ja -karjade isendid kokku					21	100	116	
KOKKU					362	101	116	

L – looduslik populatsioon; K – kasvanduse populatsioon; tärnidega tähistatud allikad: * – käesolev töö; ** – Krieg *et al.* (2000); *** – Vittas *et al.* (2011)

2.1.2. DNA eraldamine ja geneetiliste markerite analüüs

DNA eraldati kogutud uimeproovidest EMÜ vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris, kasutades NucleoSpin Tissue kitti (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) ja sellega kaasas olevat DNA eraldamise protokoll. Lühidalt, igale koeproovile lisati 180 µl lüüsipuhvrit T1 ja 25 µl proteinaas K ensüümi lahust. Seejärel inkubeeriti proove 56°C juures kaks kuni kolm tundi koeproovide täieliku lahustumiseni. Siis lisati proovidele 200 µl lüüsipuhvrit B3 ning inkubeeriti 10 minutit 70°C juures. Pärast lüüsumist tsentrifuugiti proove 5 minutit (12 000 g) ning supernatant valati uude tuubi. DNA sadestamiseks lisati 210 µl etanooli (96%) ja loksutati tugevalt. Seejärel toimus DNA sidumine filtriga, kus saadud segu kanti NucleoSpin Tissue filtrituubi, mida tsentrifuugiti üks minut (11 000 g). Järgmiseks puhastati DNAd 500 µl pesupuhvri BWga ning 600 µl pesupuhvri B5ga (mõlemal korral tsentrifuugiti proove ühe minuti jooksul 11 000 g juures). Lõpetuseks lahustati filtrituubi filtrile sadestatud DNA 100 µl 70°C BE puhvris (5 mM Tris*HCl, pH 8.5) ning säilitati -20°C juures.

2.1.2.1. MtDNA PCR-RFLP analüüs

Võimaldamaks Eesti kalakasvanduste sägakarjade geneetiliste iseärasuste võrdlust teiste Euroopa piirkondade sägapopulatsioonidega, valiti geneetiliseks markeriks mtDNA kahe piirkonna (ND5/6 ja CytB/D-ling; joonis 4) restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism (RFLP), sest nende kahe mtDNA piirkonna RFLP analüüsi metoodikat on varem kasutatud Musta ja Kaspia mere ning Vahemere basseini sägapopulatsioonide uurimisel (Krieg *et al.* 2000). ND5/6 piirkond kodeerib NADH-dehüdrogenaasi allühikuid 5 ja 6 ning CytB/D-ling piirkond sisaldab tsütokroom b kodeerivat geeni ja mittekodeerivat D-lingu ehk kontrollregiooni. Mõlemad uuritavad piirkonnad paiknevad mtDNA molekulis järjestikku (joonis 4; Vittas *et al.* 2011), nende geneetilise variatsiooni uurimiseks amplifitseeriti need kõigepealt PCRi abil, kasutades säga mitokondriaalse genoomi järjestuse põhjal (GenBank-i viitenumber NC_014261) disainitud spetsiifilisi oligonukleotiidseid praimereid:

- SglND5_6-F (AAACTCTTGGTGCAACTCCA),
- SglND5_6-R (CTGGTTAAAATCCTGGCGGG),
- SglCYTB_DL-F (TCCCGCCAGGATTTTAACCA),
- SglCYTB_DL-R (CCGTGGAACGTTTCTAGGGT).

Praimerite disainimiseks kasutati NCBI/Primer-Blast veebipõhist tarkvara (Primer-BLAST 2016). Praimeritepaar SglaND5_6 F ja R amplifitseerib mtDNA ND5/6 piirkonna 2396 aluspaari pikkuse segmendi ning praimeritepaar SglaCYTB_DL F ja R amplifitseerib CytB/D-ling piirkonna 2298 aluspaari pikkuse segmendi. Mõlema uuritava segmendi amplifitseerimiseks kasutati Biometra TProfessional termotsüklerit ja iga PCRi reaktsioon (30 µl) koosnes järgmistest komponentidest: ca 500–600 ng DNA-d, 1×Type-it PCR Kit (Qiagen) ning 200 nM lõppkontsentratsiooniga vastava piirkonna päri- ja vastassuunalist praimerit (vastavalt F ja R). Kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- algne DNA denaturatsioon 5 min temperatuuril 95 °C;
- 35 tsüklit: denaturatsioon 30 s temperatuuril 95 °C, praimerite seondumine 90 s temperatuuril 55 °C (CytB/D-ling) või 59 °C (ND5/6), praimerite ekstensioon ja uute ahelate süntees 30 s temperatuuril 72 °C;
- lõplik ekstensioon 30 min temperatuuril 60 °C.

Saadud PCRi produktide nukleotiidses järjestuses variatsioonide kindlaks tegemiseks kasutati samu restriksiooniensüüme kui Krieg *et al.* (2000) töös. ND5/6 PCR produkti lõigati viie FastDigest (Thermo Fisher Scientific Inc.) restriksiooniensüümiga (*AluI*, *RsaI*, *HinfI*, *HhaI* ja *HaeIII*) ning CytB/D-ling produkti lõigati seitsme FastDigest restriksiooniensüümiga (*AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *BstNI*, *HinfI*, *HpaII* ja *MboI*). Restriksiooni-reaktsioonide inkubeerimiseks kasutati Eppendorf Mastercycler gradient termotsüklerit ja iga reaktsioon (15 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 5 µl uuritava mtDNA piirkonna PCR produkti, 1× FastDigest Green puhvrit (Thermo Fisher Scientific Inc.), 8,5 µl ddH₂O ning 0,5 µl vastavat FastDigest (Thermo Fisher Scientific Inc.) restriksiooniensüümi. Kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- inkubatsioon 10 min temperatuuril 37 °C;
- restriksiooniensüümide inaktiveerimine 20 min temperatuuril 65 °C.

Restriksioonifragmentide visualiseerimiseks elektroforeesi reaktsioone 90 min 100V pinge juures 1,7% agarosgeelil, millele oli lisatud etiidiumbromiid (EtBr). EtBr seondub DNA, RNA ja valkudega ning muudab need nähtavaks ultraviolettkiirguse all. Fragmentide pikkuse määramiseks kasutati igal geelil GeneRuler 100 bp DNA Ladderit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Fragmendimustrite fotografeerimiseks kasutati videodokumentatsioonisüsteemi UVitec FireReader (UVitec Limited). Saadud fragmendimustreid ja fragmentide pikkuseid võrreldi iga restriksiooniensüümi puhul

Krieg *et al.* (2000) töös tooduga, määrati iga leitud mustri vastavus Krieg *et al.* (2000) nomenklatuurile ning tähistati vastava suurtähega. Seejärel omistati igale uuritud säga indiviidile komposiitne haplotüüp ehk mõlema uuritud mtDNA piirkonna (ND5/6 ja CytB/D-ling) kõigi kasutatud restriksiooniensüümide fragmendimustrite tähiste kombinatsioon. Samuti võrreldi leitud mustreid säga mtDNA mõlema uuritud piirkonna nukleotiidsete järjestuste (aluseks säga mitokondriaalse genoomi järjestus, GenBank-i viitenumber NC_014261) virtuaalsel lõikamisel saadud mustritega, kasutades NEBcutter v 2.0 tarkvara (Vincze *et al.* 2003). Selle tulemusena kaardistati iga ensüümi restriksioonisaitide paiknemine mõlema uuritud piirkonna jaoks ja kirjeldati leitud fragmendimustrid binaarses süsteemis restriksioonisaitidena (0 tähendab, et ei lõika ja 1 tähendab, et lõikab).

2.1.2.2. MtDNA D-lingu nukleotiidse järjestuse analüüs

MtDNA D-lingu piirkonna geneetilise variatsiooni uurimiseks amplifitseeriti see kõigepealt EMÜ VLI vesiviljeluse õppetooli geneetikalabori töötajate poolt PCRi abil, kasutades säga mitokondriaalse genoomi järjestuse põhjal (GenBank-i viitenumber NC_014261) disainitud spetsiifilisi oligonukleotiidseid praimereid:

- SglaDL-F (GCCCCTAACTCCCAAAGCTA),
- SglaDL-R (TGGAACGTTTCTAGGGTTCG).

Praimerite disainimiseks kasutati NCBI/Primer-Blast veebipõhist tarkvara (Primer-BLAST 2016). Praimeritepaar SglaDL-F ja R amplifitseerib mtDNA 996 aluspaari pikkuse segmendi, seal hulgas D-lingu, mis on 887 aluspaari pikkune. Uuritava segmendi amplifitseerimiseks kasutati Biometra TProfessional termotsüklerit ja iga PCR reaktsioon (10 µl) koosnes järgmistest komponentidest: ca 500–600 ng DNA-d, 1×Type-it Mpx PCR Master Mix (Qiagen) ning 200 nM lõppkontsentratsiooniga vastava piirkonna päri- ja vastassuunalist praimerit. Kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- algne DNA denaturatsioon 5 min temperatuuril 95 °C;
- 35 tsükli: denaturatsioon 30 s temperatuuril 95 °C, praimerite seondumine 90 s temperatuuril 55 °C, praimerite ekstensioon ja uute ahelate süntees 30 s temperatuuril 60 °C;
- lõplik ekstensioon 30 min temperatuuril 60 °C.

Amplifitseeritud säga mtDNA D-lingu segmendid saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse, kus need sekveneeriti Sangeri meetodil praimereid SglaDL-F ja R kasutades mõlemast PCR produkti otsast (5' ja 3').

2.1.2.3. Mikrosatelliitmarkerite analüüs

Mikrosatelliitmarkerite analüüs teostati EMÜ VLI vesiviljeluse õppetooli geneetikalabori töötajate poolt. Sägapopulatsioonide ja -karjade geneetiliseks iseloomustamiseks kasutati samas laboris välja töötatud 20 mikrosatelliitmarkerit (tabel 2), mida amplifitseeriti kahe nn multipleksse PCR reaktsiooni abil, kasutades Biometra TProfessional termotsüklerit. Analüüsitava lookuste praimerid jagati kaheks paneeliks (paneel 1 ja 2), arvestades eelnevast pilootuuringust teadaolevaid alleelide suurusvahemikke. Iga PCRi reaktsioon (10 µl) koosnes järgmistest komponentidest: 10–50 ng DNA-d, 1xType-it Multiplex Master Mix ning 200 nM lõppkontsentratsiooniga vastava paneeli päri- ja vastassuunaliste praimerite segu. Pärisuunalised ehk F-praimerid olid märgistatud 5' otsale lisatud erinevate fluoresteeruvate märgistega (tabel 2). DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist temperatuuriprofiili:

- algne denaturatsioon 5 min 95 °C
- 23 tsükli: denaturatsioon 30 s 95 °C, praimerite seondumine 90 s 61 °C praimerite ekstensioon ja uute ahelate süntees 30 s 72 °C
- lõplik ekstensioon 30 min 60°C.

Järgnevalt määrati EMÜ VLI kalakasvatuse õppetooli töötajate poolt mikrosatelliidilookuste alleelide pikkused. Selleks kasutati Applied Biosystems 3500 XL DNA analüsaatorit ja mikrosatelliidilookuste individuaalsed genotüübid määrati tarkvara Gene-Mapper v.5 (Applied Biosystems) abil.

Tabel 2. Uuritud mikrosatelliidilookuste kirjeldus

Lookus	Pärisuunalise praimeri 5' otsale lisatud fluorestseeruv märkis	Korduv motiiv	T _a (°C)	Praimeri kontsentratsioon PCR reaktsioonis (nM)
Paneel 1				
Sgla4_4	FAM	(ATCC)	61	200
Sgla4_26	FAM	(AGAT)	61	200
Sgla4_39	FAM	(AGAT)	61	200
Sgla4_8	AT550	(ATCC)	61	200
Sgla4_31	AT550	(AAAG)	61	200
Sgla4_2	AT565	(AAAT)	61	200
Sgla4_12	AT565	(AATG)	61	200
Sgla4_34	AT565	(AAAT)	61	200
Sgla4_18	YYE	(AAAG)	61	200
Sgla4_43	YYE	(ACAG)	61	200
Paneel 2				
Sgla4_13	FAM	(AAAT)	61	200
Sgla4_32	FAM	(AAAT)	61	200
Sgla4_47	FAM	(AGAT)	61	200
Sgla4_16	AT550	(AAAT)	61	200
Sgla4_44	AT550	(AGAT)	61	200
Sgla4_9	AT565	(AATC)	61	200
Sgla4_23	AT565	(AAAG)	61	200
Sgla4_46	AT565	(AGAT)	61	200
Sgla4_7	YYE	(AAAG)	61	200
Sgla4_30	YYE	(AAAT)	61	200

T_a – praimerite optimeeritud seandumistemperatuur, nM – nanomooli

2.1.3. Andmete analüüs

2.1.3.1. MtDNA PCR-RFLP

MtDNA PCR-RFLP markerite abil saadud andmete analüüs viidi läbi kolme programmiga: REAP v. 4.0 (Hered *et al.* 1992), PHYLIP v. 3.6a (Felsenstein 2005) ja MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2007).

REAP programmi abil arvutati populatsioonide haplotüübiline diversiteet (h) koos standardhällbega ($S.E.$) ja nukleotiidne diversiteet (π), mis on olulised hindamaks populatsioonide geneetilise variatsiooni taset. Sama programmi kasutati haplotüüpide vahelise evolutsioonilise distantsti hindamiseks kasutatava nukleotiidide asenduste arvu leidmiseks restriksioonisaidi kohta (d_{ij}) (Nei, Tajima 1981) ehk haplotüüpide divergeerumisindeksi leidmiseks ning samuti populatsioonide vahelise evolutsioonilise distantsti hindamiseks kasutatava nukleotiidide divergentsi (d_A) (Nei, Tajima 1981) ehk populatsioonide divergeerumisindeksi arvutamiseks. PHYLIP programmi kasutades konstrueeriti haplotüüpide ja populatsioonide divergeerumisindeksite maatriksite põhjal lähimsideme (*Neighbor-joining*) meetodil vastavalt haplotüüpide ja populatsioonide dendrogrammid, mis visualiseeriti MEGA v. 6 programmi abil.

2.1.3.2. MtDNA D-lingu nukleotiidne järjestus

Eesti Biokeskuse tuumiklaboris sekveneeritud D-lingu järjestusi analüüsiti nelja programmiga: AB Variant Reporter v. 2 (Thermo Fisher Scientific Inc.), BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.5 (Hall 2005), MEGA v. 7 (Kumar *et al.* 2016) ja DnaSP v. 6.11.01 (Rozas *et al.* 2018).

AB Variant Reporter v. 2 tarkvaraga moodustati iga isendi jaoks D-lingu nukleotiidne konsensusjärjestus praimerite SglaDL-F ja R abil saadud 5' ja 3' järjestuste põhjal, samuti selgitati selle abil välja mutatsioonid ja mutantsed isendid võrreldes referentsjärjestusega. BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7 tarkvara abil joondati kõigi isendite D-lingu järjestused. Samuti valiti eelpoolmainitud programmis välja unikaalsete haplotüüpidega järjestused ja lisati Kreeka Kastoria järve säga mtDNA D-lingu järjestus (GenBank NC_014261) referentsiks. Järgnes D-lingu haplotüüpide fülogeneetiline analüüs tarkvaraga MEGA v.7, millega leiti parim nukleotiidide asendusmudel (selleks osutus T92

ehk Tamura 3-parameetriline mudel), arvutati haplotüüpide vahelised geneetilised distantid (d_{ij}) ja koostati haplotüüpide fülogeneetilised dendrogrammid lähimsideme (*Neighbor-joining*) ja maksimaalse tõenäosuse (*Maximum Likelihood*) meetoditega. Seda tarkvara kasutati ka populatsioonidevaheliste geneetiliste distantide (d_A) arvutamiseks ja nende põhjal *Neighbor-joining* dendrogrammi koostamiseks. Populatsioonide ja karjade geneetilise variatsiooni hindamiseks kasutati tarkvara DnaSP, mille abil arvutati populatsioonide varieeruvust ja polümorfismi iseloomustavad parameetrid: haplotüüpide arv (N_{hap}), haplotüübiline diversiteet (h), nukleotiidne diversiteet (π) ja kahe viimase standardhälve ($S.E.$).

2.1.3.3. Mikrosatelliitmarkerid

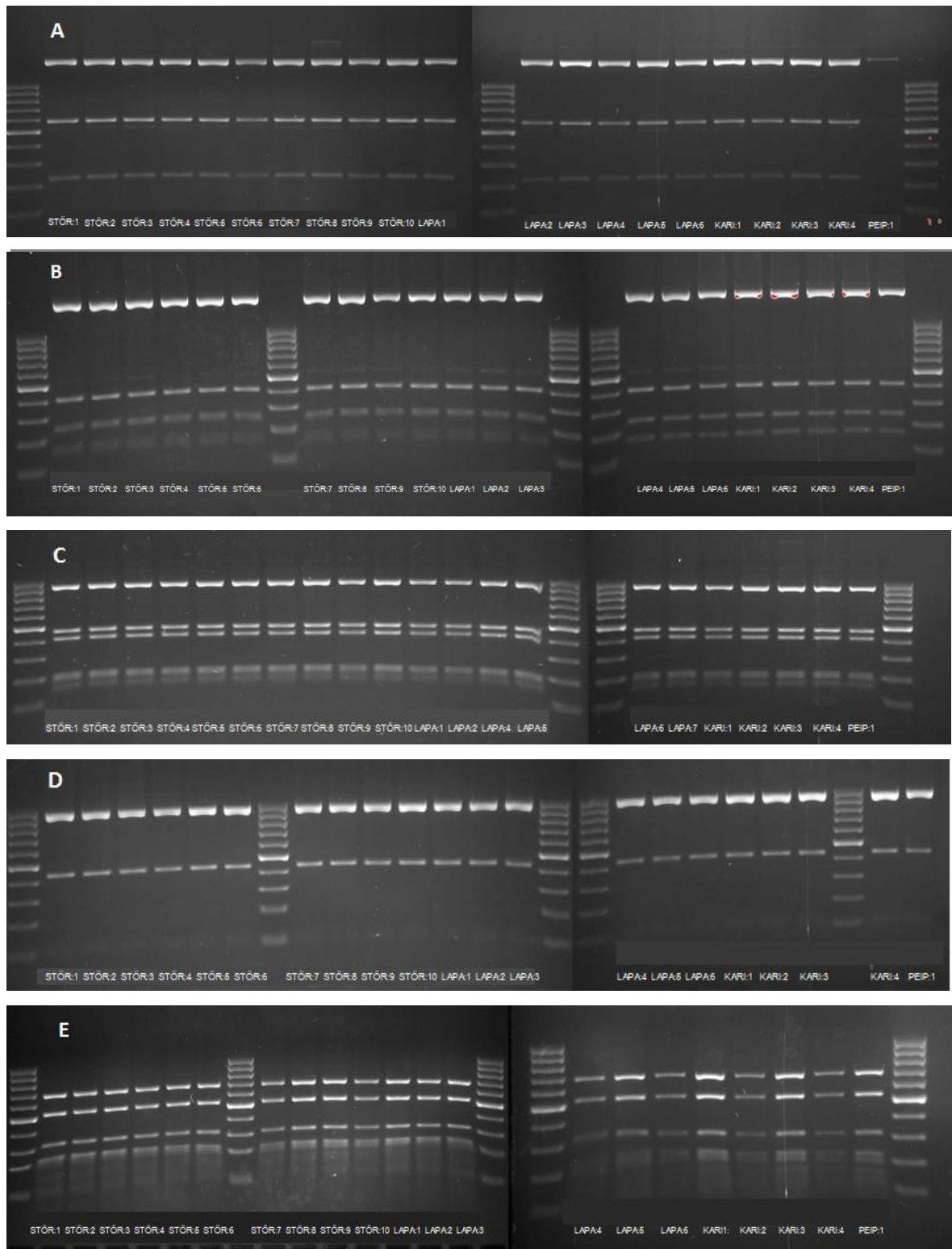
Mikrosatelliitmarkerite analüüsil kasutati järgmisi tarkvaraprogramme: FSTAT v. 2.9.3.2. (Goudet 2002), Genepop v. 4.2 (Raymond, Rousset 1995), GENETIX v. 4.05 (Belkhir *et al.* 2004), Populations v. 1.2.30 (Langella 1999) ja Structure v. 2.3.4. (Pritchard *et al.* 2009).

Populatsioonide geneetilist varieeruvust iseloomustati tarkvara FSTAT abil, hinnates uuritud mikrosatelliidilookustes esinenud alleelide keskmist arvu (A), valimi suurusest sõltumatu alleelide keskmise korrigeeritud arvukust (A_R – *allelic richness*) ning tegelikku (H_O) ja oodatavat (H_E) heterosügootsust. GENEPOP tarkvara abil hinnati mikrosatelliidilookuste alleelisageduste erinevuste olulisust populatsioonide vahel ning genotüübisageduste kõrvalekallete olulisust H-W tasakaalust. Tehtud tõenäosustestid baseerusid Markovi ahelmeetodil (Guo, Thompson 1992; Raymond, Rousset 1995), kasutades 10000 dememorisatsiooni sammu, 20 kogumit ja 5000 kordust kogumi kohta. Kuna igal populatsioonil/karjal testiti genotüübisageduste kõrvalekallete olulisust H-W tasakaalust samaaegselt 20 lookuse osas, siis puhtjuhuslikult võivad 5% riskitaseme korral ühe lookuse genotüübisagedused tasakaalust kõrvale kalduda. Saavutamaks kõigi 20 võrdluse peale kokku maksimaalset eksimistõenäosust 0,05, kasutati nn Bonferroni korrigeerimist, kus igal üksikul testil võeti olulisusnivooks $0,05/20 = 0,0025$. Populatsioonide geneetilise diferentseerumise astet (F_{ST}) ning inbriidingu taset (F_{IS}) hinnati FSTAT tarkvara abil. F_{IS} väärtuste erinevuse olulisust nullist hinnati 95% usalduspiiride abil, mis arvutati 1000 *bootstrap*-i meetodil, kasutades tarkvara GENETIX. Populatsioonide geneetilist sarnasust hinnati Nei D_A geneetilise distantssi põhjal (Nei, Chesser 1983) ja populatsioonide dendrogramm koostati Populations tarkvara abil, kasutades *lähimsideme* meetodit (Nei 1987). Populatsiooniklastrite ehk klaadide moodustamise usaldusväärsust hinnati nn. *bootstrap*-analüüsi abil, kasutades 1000 kordust. Tarkvaraprogrammiga PCAGEN (Goudet 2005) viidi läbi alleelisagedustel põhinev peakomponentanalüüs ja hinnati populatsioonide geneetilist sarnasust.

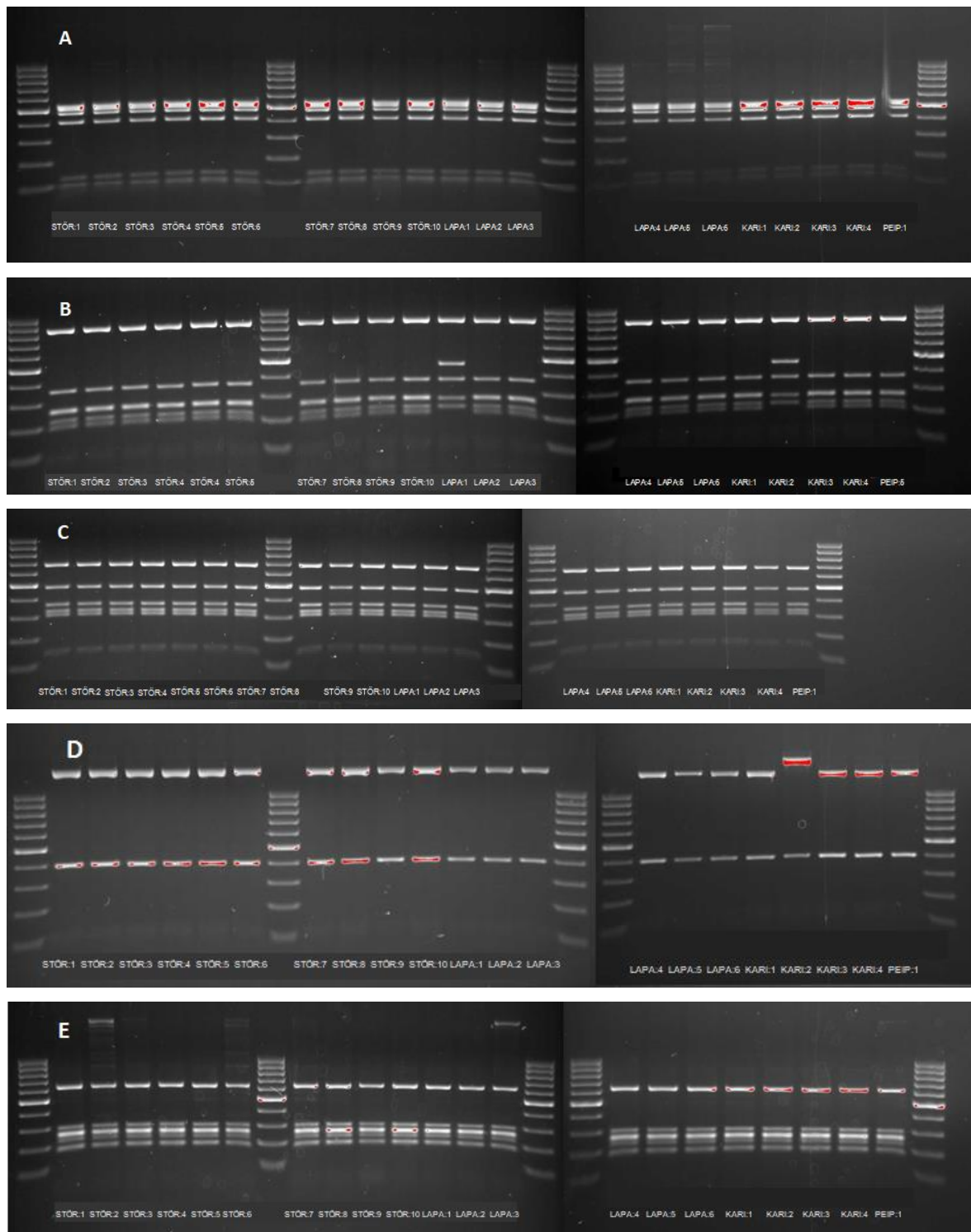
2.2. TULEMUSED

2.2.1. MtDNA PCR-RFLP

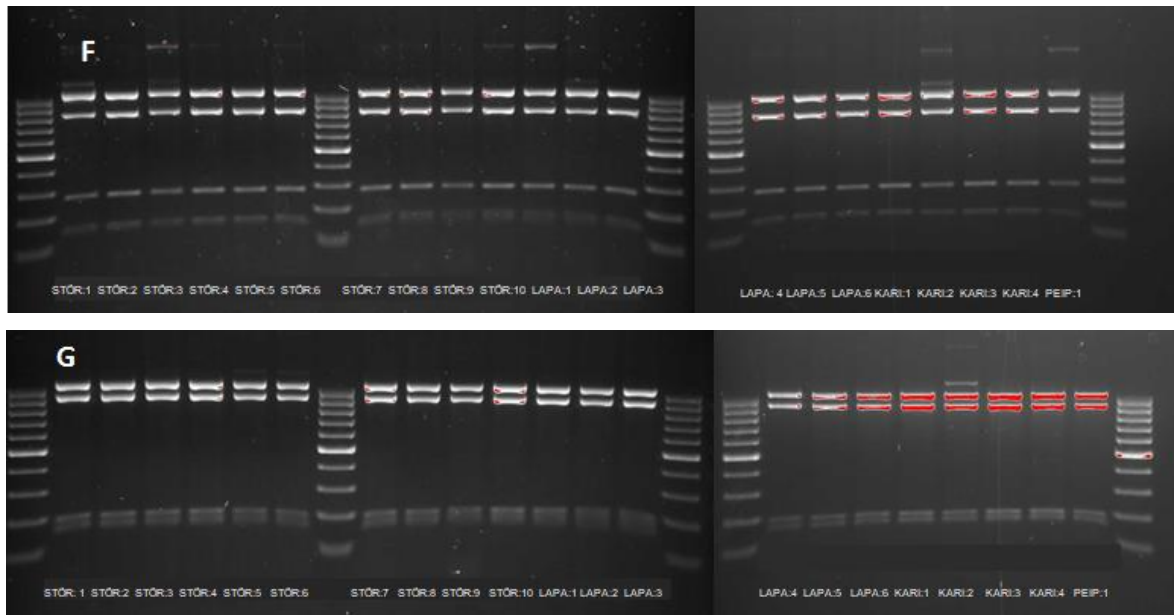
Kõigi Eesti kalakasvanduste sägakarjadest ja Peipsist kogutud 21 isendi kahe uuritava mtDNA piirkonna PCR produktide suurus vastas oodatavale – praimeritepaar SglaND5_6 F ja R amplifitseeris ND5/6 piirkonna 2396 aluspaari pikkuse segmendi ning praimeritepaar SglaCYTB_DL F ja R amplifitseeris CytB/D-ling piirkonna 2298 aluspaari pikkuse segmendi. ND5/6 piirkonna PCR produkti lõikamisel viie restriktisooniensüümiga (*AluI*, *RsaI*, *HinfI*, *HhaI* ja *HaeIII*) leiti analüüsitud sägadel vaid üks fragmendimuster iga restriktisooniensüümi kohta (joonis 5), mis kõigi ensüümide puhul vastas Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldatud mustrile A. CytB/D-ling piirkonna PCR produkti lõikamisel seitsme restriktisooniensüümiga leiti analüüsitud sägadel viie restriktisooniensüümi puhul (*AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaII* ja *MboI*) samuti vaid üks fragmendimuster iga restriktisooniensüümi kohta (joonis 6; A, C, E, F, G), mis kõigi ensüümide puhul vastas Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldatud mustrile A. Kahe restriktisooniensüümi puhul (*RsaI* ja *BstNI*) leiti aga kaks fragmendimustrit mõlema restriktisooniensüümi kohta (joonis 6; B, D), mis *RsaI* puhul vastasid Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldatud mustritele D ja E ning *BstNI* puhul mustritele A ja B.



Joonis 5. ND 5/6 piirkonna geelfotod lõigatud vastavalt *AluI* (A), *RsaI* (B), *HinfI* (C), *HhaI* (D) ja *HaeIII* (E) restriksiooniensüümidega. Joonisel märgitud indiviidide lühendite tähendused on välja toodud tabelis 3.



Joonis 6. CytB/D-ling piirkonna geelfotod lõigatud vastavalt *AluI* (A), *RsaI* (B), *HaeIII* (C), *BstNI* (D), *HinfI* (E), *HpaII* (F) ja *MboI* (G) restriksiooniensüümidega (jätkub järgmisel leheküljel) Joonisel märgitud indiviidide lühendite tähendused on välja toodud tabelis 3.



Joonis 6 (algus eelmisel leheküljel). CytB/D-ling piirkonna geelfotod lõigatud vastavalt *AluI* (A), *RsaI* (B), *HaeIII* (C), *BstNI* (D), *HinfI* (E), *HpaII* (F) ja *MboI* (G) restriksiooniensüümidega. Joonisel märgitud indiviidide lühendite tähendused on välja toodud tabelis 3.

Mõlema uuritud mtDNA piirkonna fragmendimustrite kombineerimisel iga analüüsitud säga jaoks leiti Eesti kalakasvanduste sägakarjadest ja Peipsist kogutud isenditelt kokku kolm erinevat mtDNA komposiithaplotüüpi: AAAAAADABAAA, AAAAAAEABAAA ja AAAAAAEAAAAA (tabel 3). Nendest domineeris kõigis sägakarjades haplotüüp AAAAAADABAAA, mis esines kokku 19 isendil (sh Peipsi järvest püütud isendil), haplotüüp AAAAAAEABAAA esines vaid ühel Lapavira OÜ sägakarja ja haplotüüp AAAAAAEAAAAA esines samuti vaid ühel Karilatsi Kalamajand OÜ sägakarja isendil (tabel 3). Eesti kalakasvanduste sägakarjades domineeriv komposiithaplotüüp AAAAAADABAAA (H7) esines ka Krieg *et al.* (2000) töös mõnedes Kaspia ja Musta mere vesikonna sägapopulatsioonides (Volga jõe deltas Venemaal ning Puiu järves ja Pruti jões Rumeenias), kuigi oli Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldatud 19 haplotüübi seas suhteliselt haruldane. Komposiithaplotüüpe AAAAAAEABAAA (H20L) ja AAAAAAEAAAAA (H21K) varem uuritud teiste Euroopa piirkondade sägapopulatsioonides ei esinenud ning neid võib seetõttu pidada iseloomulikuks vaid Läänemere vesikonna sägapopulatsioonidele (tabel 4).

Tabel 3. Eesti kalakasvanduse karjade ja Peipsi järve säga indiviidide mtDNA ND-5/6 ja CytB/D-ling piirkondade restriksioonifragmentide mustrid ja nendele vastavad komposiithaplotüübid

Isendi nr.	Kari/ populatsioon	Päritolu- maa	ND-5/6					Cyt B/ D-ling							Komposiithaplotüüp
			<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>AluI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>BstNI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MboI</i>	
STÖR:1	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:2	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:3	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:4	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:5	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:6	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:7	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:8	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:9	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
STÖR:10	Störfisch	Läti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
LAPA:1	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	E	A	B	A	A	A	AAAAAAEABAAA
LAPA:2	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
LAPA:3	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
LAPA:4	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
LAPA:5	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
LAPA:6	Lapavira	Leedu	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
KARI:1	Karilatsi	teadmata	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
KARI:2	Karilatsi	teadmata	A	A	A	A	A	A	E	A	A	A	A	A	AAAAAAEAAAAA
KARI:3	Karilatsi	teadmata	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
KARI:4	Karilatsi	teadmata	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA
PEIP:1	Peipsi järv	Eesti	A	A	A	A	A	A	D	A	B	A	A	A	AAAAAADABAAA

Tabel 4. MtDNA PCR-RFLP komposiithaplotüüpide esinemissagedus ja variatsioon Peipsi looduslikus sägapopulatsioonis, Eesti kasvanduste sägakarjades ja Krieg *et al.* (2000) töös uuritud populatsioonides (valitud on vaid need populatsioonid, kus esines haplotüüp H7)

Komposiithaplotüüp*	Tähis	STÖR	LAPA	KARI	PEIP	EST***	VOLG**	DDN**	PRUT**
AAAAAAAAABAAA	H1	-	-	-	-	-	0,54	0,41	-
BAAAABBABAAA	H2	-	-	-	-	-	0,15	-	-
AAAAAAAAAAAAA	H6	-	-	-	-	-	0,08	0,03	-
AAAAAADABAAA	H7	1	0,83	0,75	1	0,9	0,15	0,13	1
AAAAAACBBAAA	H8	-	-	-	-	-	-	0,09	-
ABAAAAABAAA	H9	-	-	-	-	-	-	0,28	-
AAABAAAABAAA	H10	-	-	-	-	-	-	0,03	-
AAAAAADABABA	H12	-	-	-	-	-	0,08	-	-
AAAABAAAABAAA	H15	-	-	-	-	-	-	0,03	-
AAAAAAEABAAA	H20L	-	0,17	-	-	0,05	-	-	-
AAAAAAEAAAAA	H21K	-	-	0,25	-	0,05	-	-	-
<i>n</i>		10	6	4	1	21	13	32	5
<i>Nhap</i>		1	2	2	1	3	5	7	1
<i>h</i>		0	0,333	0,5	0	0,186	0,705	0,752	0,000
S.E.		0	0,215	0,265	0	0,11	0,122	0,051	0
π		0	0,0012	0,0029	0	0,0009	0,003	0,0024	0

n – valimite suurus; *h* – haplotüübiline diversiteet; *N_{hap}* – haplotüüpide arv; S.E. – standardhälve; π – nukleotiidne diversiteet.

Karjade ja populatsioonide tähised vastavad tabelis 1 esitatule

*komposiithaplotüübid on tähistatud vastavalt Krieg *et al.* (2000) nomenklatuurile suurtähtedega järgmises järjekorras: ND-5/6: *AluI*, *RsaI*, *HinfI*, *HhaI*, *HaeIII*; CytB/D-ling: *AluI*, *RsaI*, *HaeIII*, *BstNI*, *HinfI*, *HpaII*, *MboI*. Rasvaselt on tähistatud Eesti kasvanduste sägakarjades ja Peipsi järves esinevad komposiithaplotüübid;

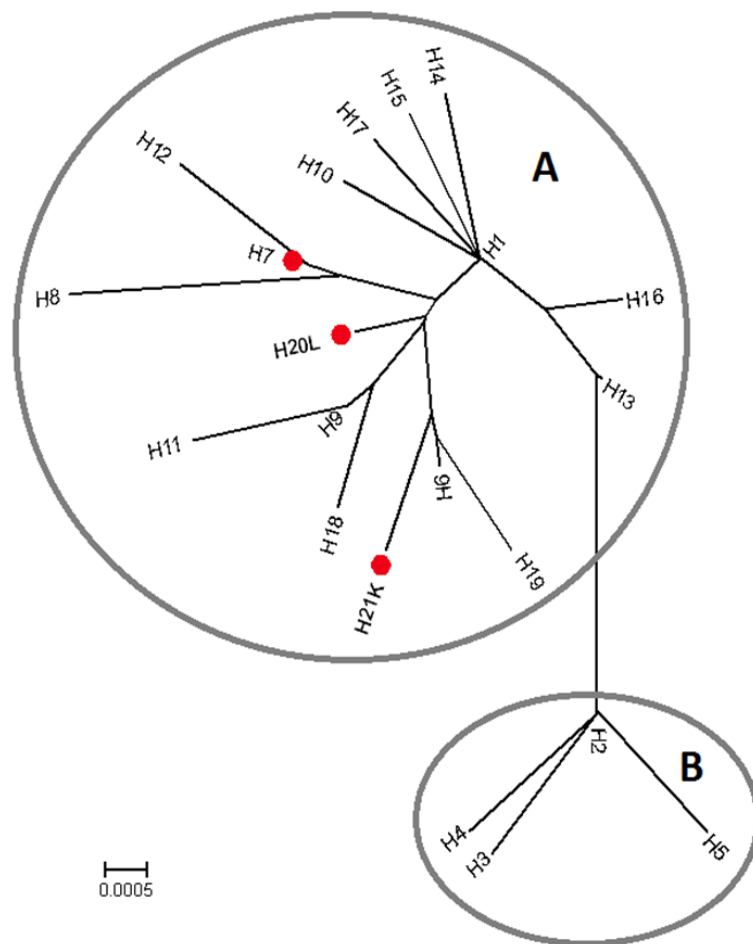
**varasema uuringu (Krieg *et al.* 2000) andmed;

*** kokku liidetud Eesti kalakasvanduste sägakarjadest ja Peipsi järvest kogutud isendite andmed.

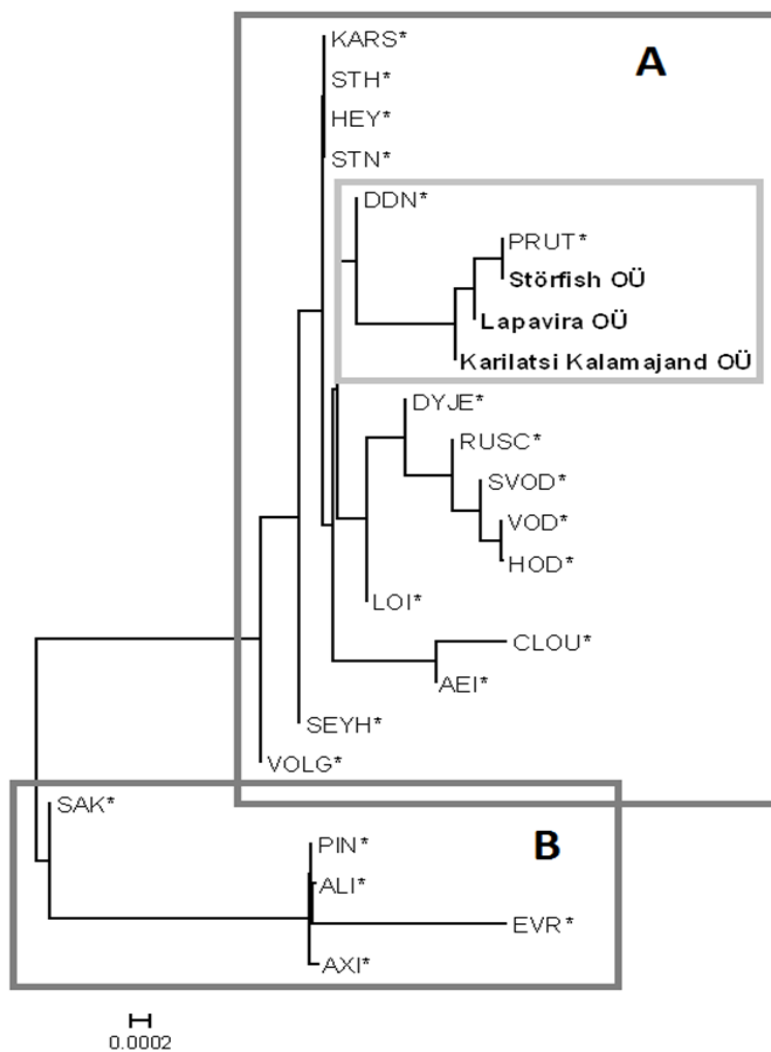
Eesti kalakasvanduste sägakarjadest olid mtDNA PCR-RFLP analüüsi põhjal geneetiliselt kõige varieeruvamad Karilatsi ja Lapavira sägakarjad, samas kui Störfischi sägakarjas variatsioon puudus (tabel 4). Kuna valimid olid väiksed, siis ei saa leitud haplotüüpide arvu ning haplotüübilise ja nukleotiidsed diversiteedi näitajaid pidada väga usaldusväärseteks Eesti kalakasvanduste sägakarjade geneetilise variatsiooni võrdlemisel ja hindamisel, kuid kõigi kolme uuritud karja ja Peipsi järve isendi andmete liitmisel (kokku 21 isendit, tabel 4) võib öelda, et Läänemere vesikonna säga populatsioonile on tervikuna iseloomulik suhteliselt madal geneetiline variatsioon võrreldes paljude teiste Euroopa piirkondade varem uuritud sägapopulatsioonidega (Krieg *et al.* 2000).

Eesti kalakasvanduste sägakarjades ja Peipsi järves leitud ning Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldatud mitokondriaalsete haplotüüpide evolutsiooniliste seoste uurimiseks konstrueeriti haplotüüpide divergeerumisindeksi (nukleotiidide asenduste arv restriksioonisaidi kohta, d_{ij}) maatriksi põhjal lähimsideme meetodil haplotüüpide dendrogramm (joonis 7). Haplotüüpide divergeerumisindeks näitab haplotüüpide geneetilist sarnasust/erinevust ning selle põhjal kuuluvad Eesti kalakasvanduste sägakarjades ja Peipsi järves esinevad haplotüübid H7, H20L ja H20K gruppi A, kuhu kuuluvad ka Krieg *et al.* (2000) töös uuritud Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondade populatsioonides esinevad haplotüübid H1 ning H6–H19 (joonis 7). Grupi B moodustavad põhiliselt Vahemere vesikonna Kreeka populatsioonides esinevad, kuid ka Venemaa (VOLG - Volga jõgi) ja Türgi (SAK - Sakarya jõgi) populatsioonides esinevad haplotüübid H2–H5 (joonis 7). Selle dendrogrammi põhjal saab väita, et Läänemere piirkonnas esinevad haplotüübid on geneetiliselt sarnased enamuse varasemalt Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondades kirjeldatud haplotüüpidega (grupp A) ja eristuvad selgelt peamiselt Vahemere vesikonnale iseloomuliku B grupi haplotüüpidest.

Eesti kalakasvanduste sägakarjade ja Krieg *et al.* (2000) töös uuritud teiste Euroopa piirkondade sägapopulatsioonide geneetilise sarnasuse/erinevuse hindamiseks konstrueeriti populatsioonide divergeerumisindeksi (nukleotiidide divergentsi, d_A) maatriksi põhjal lähimsideme meetodil populatsioonide dendrogramm (joonis 8). Selle alusel on Eesti sägakarjad geneetiliselt kõige sarnasemad Rumeenia Puiu järve (DDN) ja Pruti jõe (PRUT) populatsioonidega ning kuuluvad koos teiste peamiselt Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondade populatsioonidega gruppi A. Gruppi B kuuluvad põhiliselt Vahemere vesikonna Kreeka populatsioonid, kuid ka Türgi (Sakarya jõgi) populatsioon, kus domineerivad haplotüüpide evolutsioonilise grupi B haplotüübid H2–H5.



Joonis 7. Säga mtDNA RFLP haplotüüpide divergeerumisindeksi (d_{ij}) maatriksi põhjal lähimsideme meetodil konstrueeritud dendrogramm. Eesti kalakasvandustes esinevad haplotüübid on tähistatud punase täpiga. Käesolevas uuringus leitud uued haplotüübid on H20L ja H21K.



Joonis 8. Säga looduslike populatsioonide ja kasvanduse karjade mtDNA divergeerumisindeksi (d_A) maatriksi põhjal lähimsideme meetodil konstrueeritud dendrogramm. Eesti kalakasvanduste sägakarjad on tähistatud rasvase fondiga ja Krieg *et al.* (2000) uuringust pärinevad populatsioonid on tähistatud tärniga. Gruppi A kuuluvad enamus Krieg *et al.* (2000) populatsioonid ning Eesti kalakasvanduse karjad, B gruppi enamasti (sh SAK ehk Türgi Sakarya jõe populatsioon) Kreeka populatsioonid.

2.2.2. MtDNA D-ling

Uuritud 100 isendi D-lingu ühepikkuseks kärbitud järjestuste (893 bp) joondamisel leiti viis unikaalset haplotüüpi, mis tähistati Hap1–Hap5, et eristada neid PCR-RFLP haplotüüpide tähistustest. D-lingu haplotüüpide vastavus PCR-RFLP haplotüüpidele on esitatud tabelis 5 ja see tuletati lähtudes D-lingu piirkonna nukleotiidsete järjestuste mutatsioonide vastavusest PCR-RFLP analüüsil kasutatud ensüümide restriksioonisaitidele samadel uuritud isenditel. D-lingu järjestuste haplotüübid Hap1–Hap3 vastasid PCR-RFLP haplotüübile H7, mis näitab, et kasutatud restriksiooniensüümide komplekt ei võimaldanud välja selgitada kõiki vastavas mtDNA piirkonnas esinevaid mutatsioone, kuid suutis siiski eristada unikaalseid haplotüüpe Hap4 ja Hap5. Haplotüüp Hap1 esines kõigil uuritud Peipsi, Härjanurme ja Störfischi isenditel (ehk oli neis populatsioonides/karjades fikseerunud) ning oli kõige sagedamini esinev haplotüüp ka Lapavira sägakarjas (tabel 5). Lisaks esinesid Lapavira sägakarjas madalama sagedusega ka haplotüübid Hap2 ja Hap4, kuid haplotüübid Hap3 ja Hap5 esinesid vaid Karilatsi sägakarjas (tabel 5).

Geneetilist variatsiooni iseloomustavate parameetrite (haplotüüpide arv, haplotüübiline ja nukleotiidne diversiteet) põhjal olid Eesti kalakasvanduste sägakarjadest kõige varieeruvamad Lapavira ja Karilatsi sägakarjad, samas kui Störfischi, Härjanurme karjades ja Peipsi populatsioonis variatsioon puudus (tabel 5).

Tabel 5. D-lingu järjestuste haplotüüpide vastavus PCR-RFLP haplotüüpidele ning haplotüüpide sagedused Eesti kalakasvanduste sägakarjades ja looduslikus sägapopulatsioonis. Karjade ja populatsioonide tähised vastavad tabelis 1 esitatule

D-lingu haplotüüp	PCR-RFLP haplotüüp	STÖR	HÄRJ	LAPA	KARI	PEIP
Hap1	H7	1,00	1,00	0,50	-	1,00
Hap2	H7	-	-	0,33	-	-
Hap3	H7	-	-	-	0,75	-
Hap4	H20L	-	-	0,17	-	-
Hap5	H21K	-	-	-	0,25	-
<i>n</i>		47	30	6	4	13
<i>N_{hap}</i>		1	1	3	2	1
<i>h</i>		0,000	0,000	0,733	0,500	0,000
<i>π</i>		0,0000	0,0000	0,0037	0,0075	0,0000

n – valimite suurus; *N_{hap}* – haplotüüpide arv; *h* – haplotüübiline diversiteet; *π* – nukleotiidne diversiteet

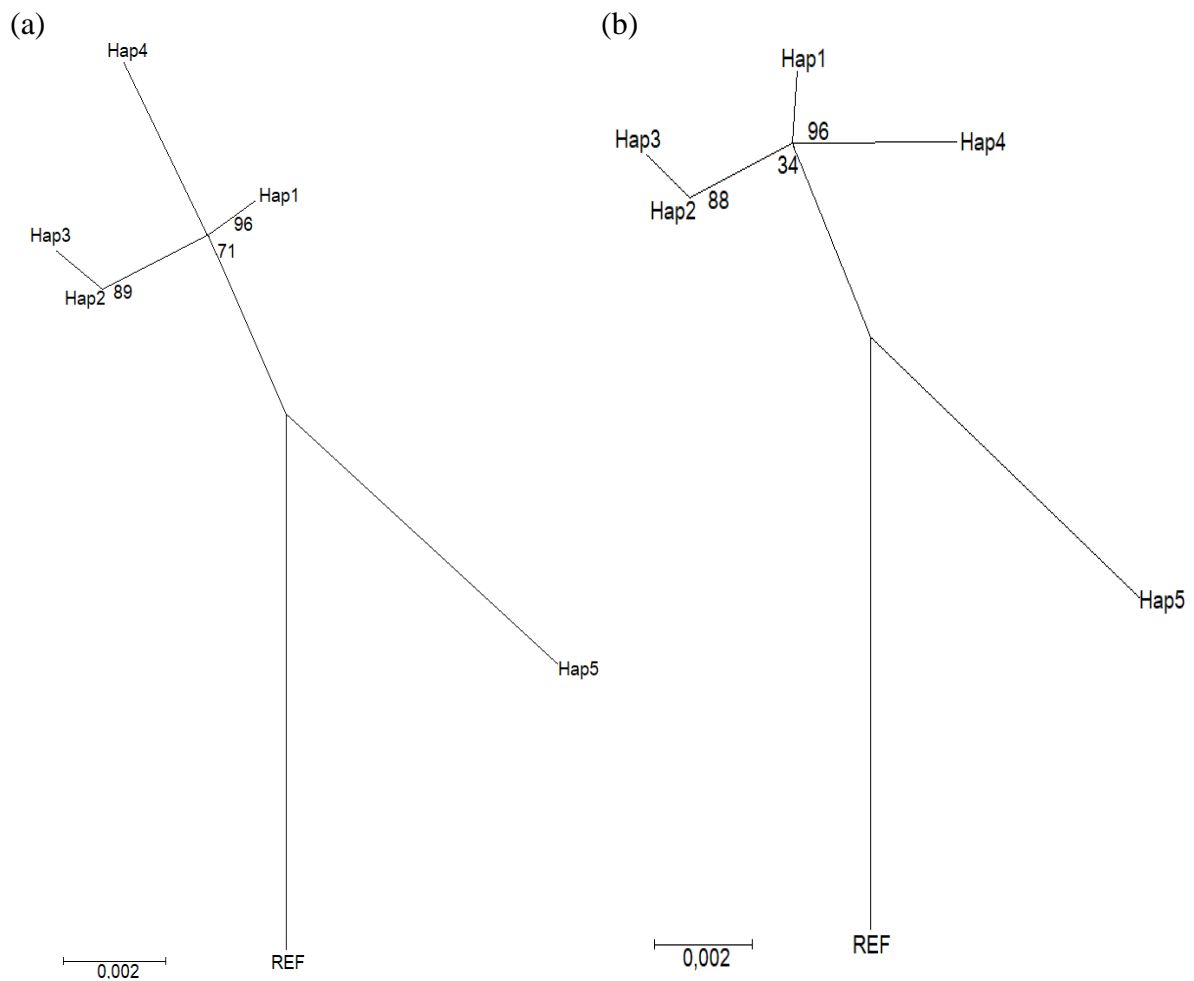
D-lingu haplotüüpide erinevuste ja fülogeneetiliste seoste uurimiseks lisati leitud viie unikaalse haplotüübi järjestustele võrdluseks ainuke GenBank-i andmebaasis leiduv säga mtDNA D-lingu järjestus (mis pärineb Kreeka Kastoria järve sägalt). Eesti sägakarjades ja

Peipsi populatsioonis leitud haplotüübid erinesid üksteisest ühe (Hap2 ja Hap3) kuni 12 (Hap3 ja Hap5) mutatsiooni võrra ning Kastoria järve referentsjärjestusest 12 (Hap1) kuni 14 (Hap3, Hap4 ja Hap5) võrra (tabel 6 ja lisa 1).

Tabel 6. D-lingu järjestuste haplotüüpide järjestuste erinevuse maatriks (mutatsioonide arv)

	REF	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5
REF	0					
Hap1	12	0				
Hap2	13	3	0			
Hap3	14	4	1	0		
Hap4	14	4	5	6	0	
Hap5	14	10	11	12	12	0

Haplotüüpide vaheliste geneetiliste distantide (d_{ij}) põhjal koostati haplotüüpide fülogeneetilised dendrogrammid lähimsideme ja maksimaalse tõenäosuse meetodeid kasutades (joonis 9a ja b). Haplotüübid Hap1–Hap4 on mõlema meetodi põhjal üksteisega geneetiliselt sarnasemad ja eristuvad selgelt Hap5 ja Kreeka Kastoria järve (REF) haplotüüpidest. Kõige sarnasemad on teineteisele haplotüübid Hap2 ja Hap3 (joonis 9a ja b), mis esinevad vastavalt Lapavira ja Karilatsi sägakarjades.

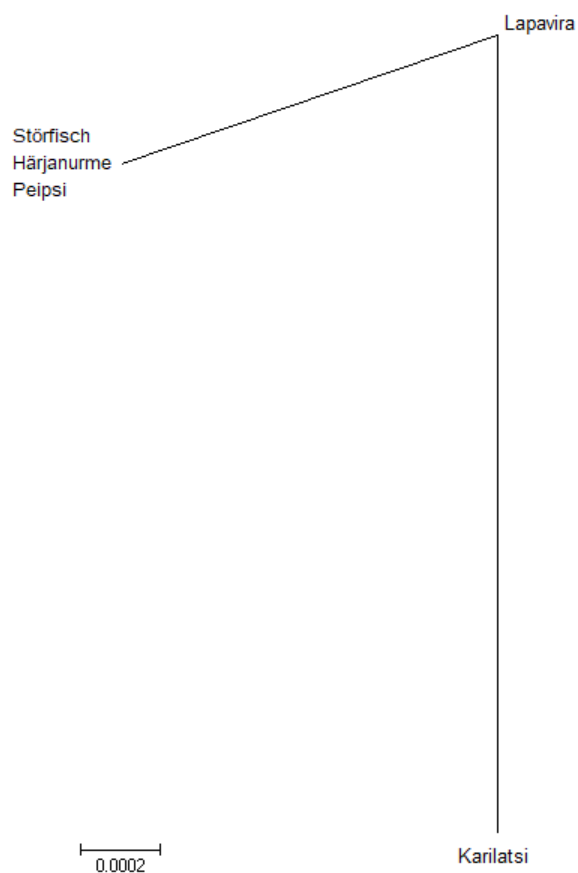


Joonis 9. Säga D-lingu haplotüüpide dendrogrammid: (a) lähimsideme meetod, (b) maksimaalse tõenäosuse meetod.

Eesti loodusliku Peipsi populatsiooni ja kasvanduste karjade geneetilise sarnasuse/erinevuse hindamiseks leiti populatsioonide divergeerumisindeksid (d_A) (tabel 7) ja koostati lähimsideme meetodil populatsioonide dendrogramm (joonis 10). Peipsi sägapopulatsioon ei erine D-lingu järjestuste põhjal Härjanurme ja Störfischi sägakarjadest (tabel 7), kuna neis kõigis on fikseeritud haplotüüp H7 (tabel 5). Nende geneetiline distant on suhteliselt väike ka Lapavira sägakarjast (0.0005), kuid oluliselt kõrgem Karilatsi sägakarjast (0.0034) (tabel 7). Neid erinevusi kajastab selgelt ka populatsioonide/karjade dendrogramm (joonis 10).

Tabel 7. Peipsi sägapopulatsiooni ja kalakasvanduste sägakarjade vaheliste D-lingu geneetilise distantide (d_A) matriks

	Peipsi	Härjanurme	Karilatsi	Lapavira	Störfisch
Peipsi	*	0,0000	0,0017	0,0003	0,0000
Härjanurme	0,0000	*	0,0017	0,0003	0,0000
Karilatsi	0,0034	0,0034	*	0,0007	0,0017
Lapavira	0,0005	0,0005	0,0011	*	0,0003
Störfisch	0,0000	0,0000	0,0034	0,0005	*



Joonis 10. Peipsi sägapopulatsiooni ja kalakasvanduste sägakarjade vahelise divergeerumisindeks (d_A) põhjal koostatud lähimsideme dendrogramm.

2.2.3. Mikrosatelliitmarkerid

Rakutuuma DNA markerite, mikrosatelliidilookuste abil, uuriti 116 indiviidi geneetilist varieeruvust ja informatiivsust. Kõik analüüsitud 20 mikrosatelliidimarkerit olid polümorfsed, see tähendab, et sisaldasid vähemalt kahte alleeli (tabel 8). Kokku registreeriti uuritud sägapopulatsioonides 107 alleeli ehk keskmiselt 5,4 alleeli lookuse kohta (tabel 8). Kõige varieeruvam lookus oli Sgla4_44 (13 alleeli) ja kõige väiksema varieeruvusega olid lookused Sgla4_12 ja Sgla 4_32 (2 alleeli). Keskmise tegelik heterosügootsus üle lookuste ja populatsioonide oli 0,550 ulatudes 0,266-st (Sgla4_30) 0,813-ni (Sgla4_47). Kõige informatiivsem populatsioonide geneetilise diferentseerumise hindamisel üle kõigi lookuste ja populatsioonide oli lookus Sgla4_39 ning kõige väheminformatiivsem oli Sgla4_13, millede F_{ST} väärtused on vastavalt 0,395 ja 0,025.

Tabel 8. Uuritud säga mikrosatelliidilookuste iseloomustus

Lookus	Korduse tüüp	Alleelide suurus- vahemik (bp)	Alleelide arv	H_O	H_E	F_{ST}
Sgla4_2	tetranukleotiidne	90-110	4	0,387	0,470	0,252
Sgla4_4	tetranukleotiidne	105-121	4	0,490	0,450	0,161
Sgla4_7	tetranukleotiidne	106-134	7	0,631	0,667	0,190
Sgla4_8	tetranukleotiidne	132-148	4	0,686	0,599	0,127
Sgla4_9	tetranukleotiidne	118-138	6	0,535	0,483	0,216
Sgla4_12	tetranukleotiidne	156-160	2	0,456	0,473	0,077
Sgla4_13	tetranukleotiidne	155-163	3	0,570	0,521	0,025
Sgla4_16	tetranukleotiidne	171-183	4	0,354	0,293	0,065
Sgla4_18	tetranukleotiidne	171-185	7	0,674	0,652	0,129
Sgla4_23	tetranukleotiidne	180-196	5	0,574	0,561	0,092
Sgla4_26	tetranukleotiidne	187-207	6	0,661	0,547	0,206
Sgla4_30	tetranukleotiidne	212-240	7	0,266	0,293	0,254
Sgla4_31	tetranukleotiidne	208-240	7	0,628	0,622	0,179
Sgla4_32	tetranukleotiidne	224-228	2	0,571	0,454	0,129
Sgla4_34	tetranukleotiidne	235-243	3	0,527	0,467	0,228
Sgla4_39	tetranukleotiidne	252-264	4	0,312	0,286	0,395
Sgla4_43	tetranukleotiidne	280-288	3	0,573	0,539	0,146
Sgla4_44	tetranukleotiidne	275-355	13	0,569	0,615	0,139
Sgla4_46	tetranukleotiidne	271-303	7	0,717	0,638	0,131
Sgla4_47	tetranukleotiidne	291-323	9	0,813	0,691	0,110
<i>Keskmine</i>			<i>5,35</i>	<i>0,550</i>	<i>0,516</i>	<i>0,163</i>

H_O – keskmine tegelik heterosügootsus; H_E – keskmine teoreetiline heterosügootsus; F_{ST} – geneetilise diferentseerituse aste üle kõigi populatsioonide

Uuritud sägapopulatsioonide geneetilist varieeruvust hinnati valimi suurusele korrigeeritud keskmise alleelide arvuga lookuse kohta ehk alleelirohkusega (A_R) ning lookuste keskmise oodatava ja tegeliku heterosügootsusega (H_E ja H_O). Alleelirohkus oli kõige madalam Störfisch ja Härjanurme sägakarjades (2,49–2,53) ning kõige kõrgem Lapavira sägakarjas (3,97; tabel 9). Peipsi populatsiooni alleelirohkus (3,35) oli veidi madalam kui Lapavira sägakarjal, kuid kõrgem kui Härjanurme ja Störfischi sägakarjadel (Tabel 9). Kui oodatav keskmine heterosügootsus oli Peipsi populatsioonil ja Härjanurme ning Störfischi sägakarjadel sarnane (0,49–0,51) ja veidi madalam kui Lapavira sägakarjal (0,59), siis tegelik keskmine heterosügootsus oli Peipsi populatsioonil oluliselt madalam kui kasvanduste sägakarjadel (vastavalt 0,40 ja 0,58–0,63; tabel 9). Samuti hinnati genotüübisageduste

kõrvalekallete olulisust H-W tasakaalust. Bonferroni korrektsooni kasutades selgus, et Peipsi populatsioonis ei esinenud statistiliselt olulisi genotüübisageduste kõrvalekaldeid Hardy-Weinbergi (P_{HW}) tasakaalust, kuid kõigis kasvanduse sägakarjades oli kõrvalekalle oluline (tabel 9). Inbriidingukoefitsient oli kõrgeim ja nullist statistiliselt oluliselt erinev Peipsi sägapopulatsioonis ($F_{IS}=0,2$), mis näitab lähisuguluspaaritusest tingitud homosügootsete genotüüpide liiga ja heterosügootsete genotüüpide defitsiiti võrreldes panmiktiles populatsioonis oodatavaga (tabel 9). Härjanurme ja Störfischi sägakarjade F_{IS} oli negatiivne ja nullist statistiliselt oluliselt erinev, mis näitab homosügootsete genotüüpide defitsiiti ja heterosügootsete genotüüpide liiga võrreldes panmiktiles populatsioonis oodatavaga ning võib olla tingitud juhuslikkusest, mis kaasneb väikese arvu sugukalade kasutamisega järglaskonna saamisel (tabel 9).

Tabel 9. Uuritud sägapopulatsioonide geneetilist varieeruvust iseloomustavad parameetrid

Populatsioon	n	A	A_R	H_E	H_O	P_{HW}	F_{IS}
Peipsi	14	3,35	3,35	0,507	0,396	n.s.	0,224*
Härjanurme	30	2,60	2,53	0,489	0,630	<0,05	-0,295*
Störfisch	47	2,50	2,49	0,486	0,597	<0,05	-0,231*
Lapavira	25	4,30	3,97	0,586	0,576	<0,05	0,017

n – isendite arv; A – alleelide keskmine arv lookuse kohta; A_R – alleelide keskmine korregeeritud arvukus ehk alleelirohkus; H_E – keskmine oodatav heterosügootsus; H_O – keskmine tegelik heterosügootsus; P_{HW} – genotüübisageduste Hardy-Weinbergi tasakaalust kõrvalekalde olulisus peale Bonferroni korrektsooni (n.s. = mitte oluline); F_{IS} – inbriidingukoefitsient; * $P < 0,05$

Sägapopulatsioonide üldine diferentseerituse tase oli suhteliselt mõõdukas ($F_{ST} = 0,161$). Eesti looduslikku päritolu Peipsi järve populatsioon oli kõige vähem diferentseerunud Lapavira sägakarjast ($F_{ST} = 0,225$) ja kõige rohkem diferentseerunud Störfischi ja Härjanurme sägakarjadest ($F_{ST} = 0,31$; tabel 10). Kõige vähem olid omavahel diferentseerunud Störfischi ja Härjanurme sägakarjad ($F_{ST} = 0,001$; tabel 10).

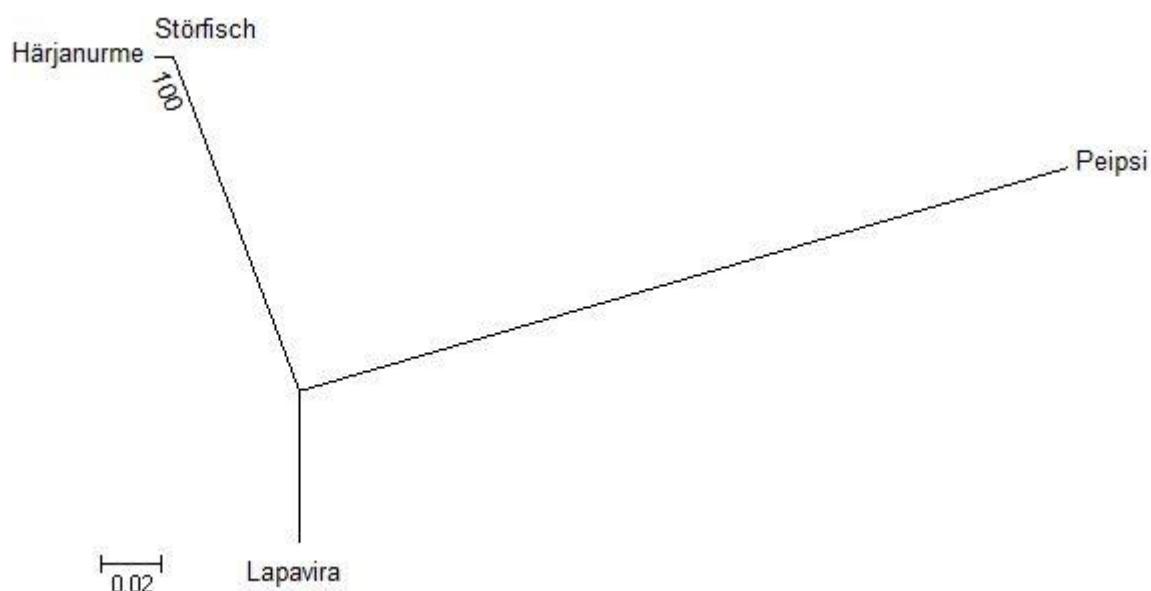
Tabel 10. Sägapopulatsioonide vaheline geneetiline diferentseeritus (F_{ST} , allpool diagonaali) ja selle statistiline olulisus (P , ülevalpool diagonaali)

	Peipsi	Härjanurme	Störfisch	Lapavira
Peipsi	*	<0,05	<0,05	<0,05
Härjanurme	0,305	*	n.s	<0,05
Störfisch	0,308	0,001	*	<0,05
Lapavira	0,225	0,152	0,144	*

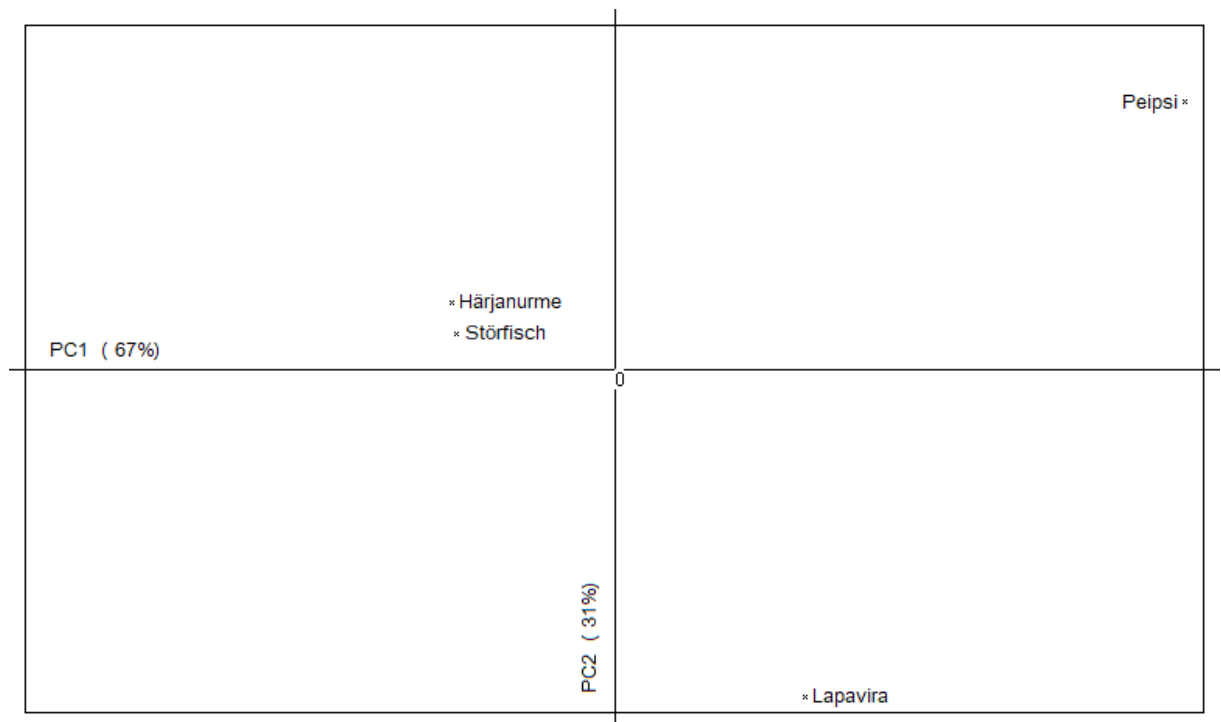
Geneetilise distantssi põhjal konstrueeritud dendrogrammil (joonis 11) moodustasid Härjanurme ja Störfischi karjad üksteisega geneetiliselt väga sarnase grupi, millest väga

selgelt eristusid Peipsi populatsioon ja Lapavira sägakari. Peipsi järve populatsioon sarnaneb geneetiliselt veidi rohkem Lapavira sägakarjale kui Härjanurme ja Störfischi karjadele (joonis 11).

Dendrogrammi joonist kinnitavad ka peakomponentanalüüsi tulemused, mille põhjal on selgelt näha kolme grupi eristumine: Peipsi populatsioon, Lapavira kari ning Störfischi ja Härjanurme karjad (joonis 12). Kogu geneetilisest varieeruvusest selgitavad PCA analüüsi kaks esimest telge kokku 98% ja esimese telje põhjal (selgitab 67% varieeruvusest) on Peipsi järve populatsioon geneetiliselt sarnasem Lapavira sägakarjaga kui Härjanurme ja Störfischi karjadega (joonis 12). Samas on teise telje põhjal (31% varieeruvusest) Peipsi järve populatsioon geneetiliselt sarnasem Härjanurme ja Störfischi karjadega.



Joonis 11. Uuritud sägapopulatsioonide vaheliste geneetiliste distantide (Nei D_A) põhjal konstrueeritud lähimsideme dendrogramm.



Joonis 12. Uuritud sägapopulatsioonide alleelisagedustel põhinev peakomponentanalüüs.

2.3. ARUTELU

Käesolevas töös uuriti mitokondriaalse ja tuuma DNA varieeruvuse alusel nelja Eesti kalakasvanduse (Störfisch OÜ, Lapavira OÜ, Kalatalu Härjanurmes ja Karilatsi kalamajand OÜ) sägakarju ning Eesti looduslikku, Peipsi järve populatsiooni, mis kõik pärinevad Läänemere vesikonnast. MtDNA PCR-RFLP meetodi puhul kasutati võrdlusena Krieg *et al.* (2000) uuringu andmestikku, mis hõlmas 13 looduslikku populatsiooni ja 8 kasvanduse karja üle kogu Euroopa, mis kuulusid Musta, Kaspia ja Vahemere ning Atlandi ookeani vesikondadesse. Lisaks kasutati mtDNA D-lingu järjestuste võrdlevaks analüüsiks säga mtDNA genoomi referentsjärjestust, mis on saadud Kreeka Kastoria järve indiviidilt. Mikrosatelliitmarkerite puhul ei olnud otsene võrdlus teiste varem koostatud uurimistöödega võimalik, kuna EMÜ VLI vesiviljeluse õppetooli töötajate poolt töötati välja uued, varasematest erinevad, mikrosatelliitmarkerid.

Eesti kalakasvanduste sägakarjades ja Peipsi järve populatsioonis leiti PCR-RFLP meetodi abil mtDNA ND5/6 ja CytB/D-lingu piirkonnas 3 erinevat haplotüüpi (H7, H20 ja H21) ja D-lingu järjestuste sekveneerimisel leiti kokku 5 haplotüüpi, millest 3 vastasid PCR-RFLP haplotüübile H7 ja teised kaks haplotüübidele H20 ja H21. Seega on D-lingu järjestuste sekveneerimise meetod informatiivsem kui PCR-RFLP meetod. Leitud haplotüüpidest domineeris H7 arvukuselt kõigis uuritud karjades ning esines ka mõnedes Krieg *et al.* (2000) töös käsitletud Kaspia ja Musta mere vesikonna sägapopulatsioonides (Volga jõe deltas Venemaal ning Puiu järves ja Pruti jões Rumeenias). Haplotüübi H7 domineerimine kõigis Eesti kalakasvanduste sägakarjades ja Peipsi järve populatsioonis näitab, et need on emaliinide poolest üksteisega geneetiliselt sarnased. Karilatsi Kalamajand OÜ ja Lapavira OÜ sägakarjades leiti Krieg *et al.* (2000) töös kirjeldamata haplotüübid H20 ja H21, mis on ilmselt unikaalsed Läänemere vesikonnale. Kuna Krieg *et al.* (2000) oma töös Läänemere vesikonda ei uurinud, on kahe uue haplotüübi leidmine ootuspärane.

Kuna uuritud valimid olid väiksed ($n = 1-10$), siis ei saa ainuüksi mtDNA PCR-RCLP meetodil leitud haplotüüpide arvu ning haplotüübilise ja nukleotiidsed diversiteedi näitajaid pidada usaldusväärseteks Eesti kalakasvanduste sägakarjade geneetilise varieeruvuse võrdlemisel ja hindamisel, kuid kõigi kolme uuritud karja ja Peipsi järve isendite andmete liitmise tulemuste põhjal võib väita, et Läänemere vesikonna säga populatsioonidele on

tervikuna iseloomulik suhteliselt madal geneetiline varieeruvus, võrreldes paljude teiste Euroopa piirkondade varem uuritud sägapopulatsioonidega (Krieg *et al.* 2000). MtDNA D-lingu järjestamise meetodil selgus, et Lapavira ja Karilatsi sägakarjade geneetiline varieeruvus on kõrgem kui Peipsi populatsioonil ja Härjanurme ning Störfišchi karjadel, kuid üldkokkuvõttes on Läänemere vesikonna sägakarjades ja -populatsioonides siiski suhteliselt madal geneetiline varieeruvus. See võib olla tingitud nii väikese arvu sugukalade kasutamisest kasvanduste sägakarjade paljundamisel kui ka nn. rajajaefektist põhjapoolsete alade rekoloniseerimisel peale viimast jääaega suhteliselt vähese arvu koloniseerijate poolt. Samuti on teada, et üldiselt ongi populatsioonide areaali piirialadel, nagu säga puhul Eestis, geneetiline varieeruvus madalam (Hoffman, Blows 1994).

MtDNA PCR-RFLP meetodil koostatud haplotüüpide divergeerumisindeksil põhinev dendrogramm näitab haplotüüpide geneetilist erinevust või sarnasust ning selle põhjal saab öelda, et Eesti sägakarjades ja Peipsi järves esinevad haplotüübid, mida võib käsitleda iseloomulikena Läänemere vesikonnale, on geneetiliselt sarnased enamuse Krieg *et al.* (2000) töös Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondades kirjeldatud haplotüüpidega. Antud magistritöös uuritud karjades ja populatsioonides leitud haplotüübid eristusid selgelt peamiselt Vahemere vesikonnale iseloomulikest haplotüüpidest. Populatsioonide geneetilist sarnasust või erinevust kirjeldava dendrogrammi alusel on Eesti sägakarjad geneetiliselt kõige sarnasemad Krieg *et al.* (2000) töös uuritud Rumeenia Puui järve ja Pruti jõe populatsioonidega ning moodustavad koos teiste peamiselt Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondade populatsioonidega grupi, mis eristub populatsioonide grupist, kuhu kuuluvad põhiliselt Vahemere vesikonna Kreeka populatsioonid, kuid ka näiteks Türgi (Sakarya jõgi) populatsioon. Samas kuuluvad mõned Kreeka populatsioonid geneetilise sarnasuse põhjal gruppi A, mis näitab, et Euroopa sägapopulatsioonidel puudub selgelt eristatav geograafiline struktuur, mis võib olla põhjustatud sellest, et viimase jääaja järgselt koloniseeriti jääst vabanenud territooriumid ühisest refuugiumist. Nimelt olid Must, Kaspia ja Vahemeri jääajal ühendatud ja seetõttu oli võimalik populatsioonidevaheline geneetilise materjali vahetus, mis välistas piirkonnale omase geneetilise struktuuri tekke (Bianco 1990; Economidis, Banarescu 1991). Viimast kinnitab ka Krieg *et al.* (2000) mtDNA PCR-RFLP meetodil tehtud sägapopulatsioonide uuring, kus ei leitud kindlat haplotüüpide geograafilist jaotust. Sarnaselt leiti ka populatsioonide uurimisel mikrosatelliitmarkeritega Triantafyllidis *et al.* (2002) artiklis, kus kirjeldati

sägapopulatsioonide geograafilise struktuuri puudumist ning jääaegse sägapopulatsioonide refuugiumina tuuakse ühe võimalusena välja Ponto-Kaspia regiooni, kust siis hiljem üle Euroopa leviti.

MtDNA D-lingu sekveneerimisel leitud haplotüüpide fülogeneetilised dendrogrammid on põhimõtteliselt sarnased PCR-RFLP meetodil saadud dendrogrammidega ja näitavad, et Eesti sägakarjades ja Peipsi populatsioonis esinevad haplotüübid Hap1–Hap4, mis vastavad PCR-RFLP haplotüüpidele H7 ja H21L on üksteisega geneetiliselt sarnased ning eristuvad Karilatsi karjas leitud unikaalsest haplotüübist Hap5 (PCR-RFLP haplotüüp H22K), Kõik leitud viis haplotüüpi eristuvad omakorda selgelt Kreeka Kastoria järve (Vahemere vesikond) säga haplotüübist. D-lingu järjestuste põhjal leitud geneetiliste distantside põhjal ei erine Peipsi järve populatsioon Läti päritolu Härjanurme ja Störfischi sägakarjadest, kõigis neis on fikseerunud haplotüüp Hap1. Mõnevõrra väiksem on Peipsi populatsiooni geneetiline sarnasus Lapavira sägakarjaga. Kõige rohkem erineb aga Peipsi populatsioon Karilatsi kasvanduses peetavatest sägadest, mille päritolu on kahjuks teadmata.

Ka DNA mikrosatelliitide variatsiooni analüüs näitas, et Lapavira sägakarja geneetiline varieeruvus, hinnatuna alleelirohkuse ja oodatava heterosügootsuse kaudu, on kõrgem kui Peipsi populatsioonil ja Härjanurme ning Störfischi karjadel. Samas oli aga Peipsi populatsioonil tegelik keskmine heterosügootsus oluliselt madalam kui kõigil kasvanduste sägakarjadel ja tema inbriidingukoefitsient oli suhteliselt kõrge, mis näitab lähisuguluspaaritusest tingitud homosügootsete genotüüpide liiga ja heterosügootsete genotüüpide defitsiiti võrreldes panmiktilises populatsioonis oodatavaga. Lähisuguluspaaritused Peipsi populatsioonis on ilmselt tingitud väga väikesest efektiivsest populatsioonimahust. Härjanurme ja Störfischi sägakarjade inbriidingukoefitsient oli aga hoopis negatiivne, mis võib olla tingitud juhuslikkusest, mis kaasneb väikese arvu sugukalade kasutamisega järglaskonna saamisel. Samasuguse tulemuse Prantsusmaa, Taani ja Rumeenia kasvanduse sägakarjade puhul on saanud ka Triantafyllidis *et al.* (2002), kui tema kõik uuritud 5 Doonau ja Elbe jõe päritolu kasvanduse karja näitasid heterosügootsete genotüüpide liiga.

Mikrosatelliitide puhul esines statistiliselt olulisi kõrvalekaldeid genotüübisageduste Hardy-Weinbergi tasakaalust käesolevas töös vaid kasvanduse populatsioonides, mis võib tuleneda mittejuhuslikust paarumisest väikses populatsioonis või null-alleelide esinemisest mõnes

markerlookuses (Allendorf, Luikart 2007). Mittejuhuslik paarumine võib omakorda viia inbriinguni ehk sugulasaretuseni, mille tulemusena väheneb elulisus ja paljunemisedu (Beaumont *et al.* 2010). Peipsi populatsiooni ja Eesti kasvanduste sägakarjade geneetilise variatsiooni otsene võrdlus teiste varem uuritud Euroopa sägapopulatsioonidega ei ole kahjuks võimalik, sest käesolevas töös kasutatud mikrosatelliitmarkerite komplekt erineb teiste autorite (Triantafyllidis *et al.* 2002; Palm *et al.* 2008) poolt kasutatust. Samas on Rootsi sägapopulatsioonide geneetiline muutlikkus oluliselt madalam kui Kaspia, Musta ja Vahemere vesikonna populatsioonidel (Triantafyllidis *et al.* 2002; Palm *et al.* 2008) ning võib eeldada, et ka Eesti, Läti ja Leedu sägapopulatsioonidele on üldiselt iseloomulik madal geneetilise variatsiooni tase.

Mikrosatelliitmarkerite põhjal oli uuritud karjade ja populatsiooni geneetiline diferentseeritus suhteliselt mõõdukas. Kõige vähem diferentseerunud omavahel olid Läti päritolu Störfischi ja Härjanurme sägakarjad, mis on ka ootuspärane, kuna nad pärinevad ühest ja samast Eestisse toodud noorkalade partiist. Eesti looduslik Peipsi järve populatsioon oli vähim diferentseerunud Leedu päritolu (Lapavira) sägakarjast ja kõige rohkem Läti (Härjanurme, Störfisch) päritolu sägakarjadest. Seda, et Peipsi populatsioon sarnaneb mikrosatelliitide põhjal veidi enam Leedu päritolu sägakarjale kui Läti päritolu sägakarjale, näitab ka geneetilise distantse põhjal koostatud dendrogramm. Seega on mööda emaliini päranduva mtDNA põhjal Peipsi populatsioon kõige sarnasem Läti päritolu sägadele, kuid rakutuuma DNA mikrosatelliitsete markerite põhjal, mille variatsiooni panustavad mõlemad vanemad, on geneetiline sarnasus kõige suurem Leedu päritolu sägakarjaga. Selle erinevuse põhjuseks võib olla asjaolu, et efektiivne populatsioonimaht on mtDNA puhul neli korda madalam kui rakutuuma DNA puhul (Abdul-Muneer 2014) ja seetõttu mõjutab väikesest populatsioonimahust tingitud juhuslik geenitriiv mtDNA haplotüüpide esinemissagedusi palju rohkem kui rakutuuma DNA markerite alleelisagedusi. Just sel põhjusel võivad Peipsi populatsioon ja Läti päritolu sägakarjad olla fikseerunud Läänemere vesikonnas kõige sagedamini esineva mtDNA haplotüübi suhtes.

Käesolevas töös leidis kinnitust hüpotees, et Eesti kalakasvanduste sägakarjad ja Peipsi järve looduslik populatsioon on emaliinide poolest üksteisega geneetiliselt sarnased ning erinevad teiste Euroopa piirkondade varem uuritud populatsioonidest. Samuti leidis osaliselt kinnitust töö teine hüpotees, et Läti ja Leedu päritolu sägad võivad geneetilise sarnasuse tõttu sobida Eesti säga populatsiooni taastamiseks, sest uuritud Peipsi sägal esines sama mtDNA

haplotüüp, mis domineeris Läti ja Leedu päritolu sägakarjades. Kõige paremini võiksid Eesti loodusliku Peipsi järve populatsiooni täiendamiseks sobida Leedu päritolu Lapavira sägakarja isendid, kuna mikrosatelliitmarkerite analüüs näitas Peipsi populatsiooni kõige suuremat geneetilist sarnasust Leedu päritolu karjaga. Samas on Lapavira karjal ka kõige kõrgem geneetiline varieeruvus nii mtDNA kui rakutuuma DNA mikrosatelliitide osas, mis võimaldaks suurendada Peipsi järve populatsiooni geneetilist mitmekesisust ja likvideerida inbriidingut. Vastasel juhul võib populatsiooni isenditel esineda madal elujõulisus, madal kasvukiirus ja paljunemisedu ehk inbriidingudepressioon (Beaumont *et al.* 2010). Geneetilise variatsiooni piisava taseme tagamine on omakorda väga oluline komponent liikide kaitse tegevuskavades, sest tänu sellele on võimalik liigi kohastumine muutuvate keskkonnatingimustega ja kokkuvõttes sõltub sellest populatsioonide jätkusuutlikkus (Singh *et al.* 2011). Positiivseid näiteid sägapopulatsioonide täiendamise kohta on Rootsist, kus madala geneetilise varieeruvusega Helgeå populatsiooni täiendati teistest veekogudest pärit isenditega, mille tulemusena on varieeruvus täiendatud populatsioonis kasvanud (Jansson 2012).

KOKKUVÕTE

Säga on Eestis haruldane liik, kuuludes II kaitsekategooriasse ning Eesti Punase Raamatu eriti ohustatud liikide nimistusse. Tema geneetiliste iseärasuste väljaselgitamine on väga oluline geneetilise mitmekesisuse säilitamiseks või taastamiseks nii looduslikes populatsioonides kui kasvanduse karjades. Magistritöö eesmärkideks oli välja selgitada säga loodusliku Peipsi populatsiooni ja Eestisse imporditud kasvanduste karjade geneetilised iseärasused ja hinnata kasvanduse karjade sobivust loodusliku populatsiooni täiendamiseks. Uurimistöö materjal (kokku 120 isendi koeproovid) koguti aastatel 2015–2017 Peipsi järvest ja Emajõe alamjooksult (kokku 14 koeproovi) ning neljast Eesti kalakasvandusest: Lapavira OÜ, OÜ Karilatsi Kalamajand, Kalatalu Härjanurmes ja Störfisch OÜ (kokku 106 koeproovi). Kõigilt isenditelt võeti koeproov kõhuuimest, mis säilitati 96% etanoolis. Kalakasvandustest koguti kokku 106 koeproovi ja Peipsi järvest saadi kutseliste kalurite abiga 14 loodusliku säga koeproovi. Geneetiliste markeritena kasutati mitokondriaalse DNA (mtDNA) kahe piirkonna (ND5/6 ja CytB/D-ling) restriksioonifragmentide pikkuspolümorfismi (RFLP), mtDNA D-lingu nukleotiidset järjestust ja rakutuuma DNA lühikesi tandeemseid korduvjärjestusi ehk mikrosatelliite.

Töö tulemusena leiti Peipsi populatsioonis ja kasvanduse sägakarjades mtDNA D-lingu sekveneerimisel viis erinevat mtDNA haplotüüpi, mis vastasid kolmele PCR-RFLP meetodil leitud haplotüübile. Nendest kõige suurema sagedusega esinevat haplotüüpi H7 on varem leitud ka mõnedes Kaspia ja Musta mere vesikonna sägapopulatsioonides (Volga jõe deltas Venemaal ning Puiu järves ja Pruti jões Rumeenias), kuid kahte haplotüüpi ei ole teistes sägapopulatsioonides varem kirjeldatud. Eesti sägakarjades ja Peipsi järves esinevaid haplotüüpe võib käsitleda iseloomulikena Läänemere vesikonnale ning need on geneetiliselt sarnased enamuse Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondades varem kirjeldatud haplotüüpidega, kuid eristuvad selgelt peamiselt Vahemere vesikonnale iseloomulikest haplotüüpidest. D-lingu sekveneerimine näitas Leedu päritolu Lapavira sägakarja kõige suuremat geneetilist varieeruvust ning Peipsi populatsioonis ja Läti päritolu karjades varieeruvuse puudumist. Viimast võib põhjustada väike sugukalade arv järglaskonna saamisel või rajajaefekt põhjapoolsete alade jääaja järgsel rekoloniseerimisel.

Peipsi järve looduslik populatsioon on emaliini poolest kõige sarnasem Läti päritolu sägadega, kuid erinevus ei ole suur ka Leedu päritolu Lapavira sägakarjast. Võrreldes teiste Euroopa piirkondadega on Eesti, Läti ja Leedu sägakarjad emaliinide poolest geneetiliselt kõige sarnasemad Rumeenia Puiu järve ja Pruti jõe populatsioonidega ning moodustavad koos teiste peamiselt Musta ja Kaspia mere ning Atlandi ookeani vesikondade populatsioonidega ühtse grupi, mis eristub Vahemere vesikonna Kreeka populatsioonidest.

Mikrosatelliitmarkerite analüüsi tulemusena registreeriti uuritud sägapopulatsioonides kokku 107 alleeli ehk keskmiselt 5,4 alleeli lookuse kohta. Leedu päritolu sägakarja geneetiline varieeruvus oli kõrgem kui Peipsi populatsioonil ja Läti päritolu karjadel. Samas oli aga Peipsi populatsiooni tegelik keskmine heterosügootsus oluliselt madalam kui kõigil kasvanduste sägakarjadel ja tema inbriidingukoefitsient oli suhteliselt kõrge, mis viitab väga väikesest efektiivsest populatsioonimahust tingitud lähisuguluspaaritustele. Läti päritolu sägakarjade inbriidingukoefitsient oli aga hoopis negatiivne, mis võib olla tingitud juhuslikkusest, mis kaasneb väikese arvu sugukalade kasutamisega järglaskonna saamisel. Mikrosatelliitmarkerite põhjal on Eesti looduslikku päritolu Peipsi järve populatsioon geneetiliselt kõige sarnasem Leedu päritolu sägakarjaga ja mitte palju erinevam ka Läti päritolu sägakarjadest.

Käesolevas tööd leidis kinnitust hüpotees, et Lätist ja Leedust pärinevad Eesti kalakasvanduste sägakarjad on emaliinide poolest üksteisega geneetiliselt sarnasemad ja need erinevad teiste Euroopa piirkondade varem uuritud populatsioonidest. Samuti leidis osaliselt kinnitust teine hüpotees, mille kohaselt võiks Läti ja Leedu päritolu sägakarjad sobida Peipsi loodusliku sägapopulatsiooni täiendamiseks. D-lingu sekveneerimise ja mikrosatelliitmarkerite analüüsi tulemustest selgus, et geneetiliselt kõige varieeruvam on Lapavira kasvanduse Leedu päritolu sägakari, mis mikrosatelliitide põhjal on ka kõige sarnasem Peipsi populatsioonile. Seetõttu võiks just Lapavira sägakari olla kõige sobivam Peipsi järve populatsiooni täiendamiseks, võimaldades suurendada selle geneetilist variatsiooni ja likvideerida inbriidingut. „Eesti kalakasvatuseliku taastootmise tegevuskava“ alusel vajab sägapopulatsiooni täiendamine eeluuringuid, sest võimalused, kuidas populatsiooni püügiks piisavale tasemele tõsta, vajavad selgitamist. Käesolevat magistrilitööd võiks pidada üheks oluliseks osaks sellest eeluuringust enne sägapopulatsioonide täiendamisega alustamist Eestis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abdullayev, M. A., Khakberdiyev, B., Urchinov, D.** (1978). Biology of the European catfish (*Silurus glanis*) from lakes in the lower reaches of the Zarafshan River and Khorezm Province. – *Journal of Ichthyology*. 17, pp. 487–491.
- Abdul-Muneer, P. M.** (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. – *Genetics Research International*. Volume 2014. 11 p.
- Allendorf, F. W., Luikart, G.** (2007). Conservation and the genetics of populations. University of Montana. Blackwell Publishing. 663 p.
- Alp, A., Kara, C.** (2004). Reproduction biology in a native European catfish *S. glanis*, 1758, population in Menzelet Reservoir. – *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*. 28, pp. 613–622.
- AnimalBase.** (2012). [on-line] <http://www.animalbase.org/> (20.05.2018).
- Avise, J. C., Selander, R. K.** (1972). Evolutionary genetics of cave-dwelling fishes of the genus *Astyanax*. – *Evolution*. 26, pp. 1–19.
- Baikov, A., Gross, R., Hurt, M., Järvalt, A., Jaanuska, H., Järvekülg, R., Kesler, M., Klaas, K., Krause, T., Paaver, T., Tambets, M., Vasemägi, A., Verliin, A., Saadre, E.** (2017). Kalakasvatustliku taastootmise tegevuskava 2017–2019, perspektiiviga kuni 2023: Ohustatud sh kaitsealuste ja vääriskalaliikide seisundi parandamiseks vajalikud meetmed ja eelistatud tegevused. Tartu. 70 lk.
- Beardmore, A. L., Mair, C. G., Lewis, C. G.** (1997). Biodiversity in aquaticsystems in relation to Aquaculture. – *Aquaculture. Research*. 28, pp. 829–839.
- Beaumont, A., Boudry, P., Hoare, K.** (2010). Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. Second edition. Wiley-Blackwell. 193 p.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme F.** (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bianco, P. G.** (1990). Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euromediterranean freshwater fishes. – *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. 1, pp. 167–184.
- Billington, N., Hebert, P. D. N.** (1991). Mitochondrial DNA diversity of fishes and its implications for introductions. – *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 48 (Suppl. 1), pp 80–94.
- Birky, C. W., Maruyama, T., Fuerst, P.** (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. – *Genetics*. 103, pp 513–527.

- Boore, J. L.** (1999). Animal mitochondrial genomes. – *Nucleic Acids Research*. 27, pp. 1767–1780.
- Breve, N. W. P., Verspui, R., Laak, G. A. J., Bendall, B., Breukelaar, A. W., Spierts, I. L.Y.** (2014). Explicit site fidelity of European catfish (*Silurus glanis*, L., 1758) to man-made habitat in the River Meuse, Netherlands. – *Journal of applied ichthyology*. 30, pp. 472–278.
- Britton J. R., Pegg, J.** (2007). Investigating the catch returns and growth rate of Wels catfish (*Siluris glanis*), using mark-recapture. – *Fisheries Management and Ecology*. 14, pp. 263–268.
- Britton, J. R., Cucherousset, J., Davies, G. D., Godard, M. J., Copp, G. H.** (2010). Non-native fishes and climate change: predicting species responses to warming temperatures in a temperate region. – *Freshwater Biology*. 55(5), pp. 1130–1141.
- Bruton, M. N.** (1996) Alternative life-history strategies of catfishes. – *Aquatic Living Resources*. 9, pp. 35–41.
- Carol, J., Benejam, L., Alcaraz, C.** (2007a). The effects of limnological features on fish assemblages of 14 Spanish reservoirs. – *Ecology of Freshwater Fish*. 15, pp. 66–77.
- Carol, J., Zamora, L., Garcia-Berthou, E.** (2007b). Preliminary telemetry data on the patterns and habitat use of European catfish (*Silurus glanis*) in a reservoir of the River Ebro, Spain. – *Ecology of Freshwater Fish*. 16, pp. 450–456.
- Coche, A., Edwards, D.** (1989). Selected aspects of warmwater fish culture. T8389. Fisheries and Aquaculture Department. Fisheries and Aquaculture Management Division. 181 p.
- Copp, G. H., Britton, J. R., Cucherousset, J., García-Berthou, E., Kirk, R., Peeler, E., Stakenas, S.** (2009). Voracious invader or benign feline? A review of the environmental biology of European catfish *Silurus glanis* in its native and introduced ranges. – *Fish and Fisheries*. 10(3), pp. 252–282.
- Draskiewicz-Mioduszevska, H., Woos, A., Mickiewicz, M.** (2014). State of Polish fisheries in flowing inland waters in 2012. Osa 1. Authorized to fisheries, fishery districts, economic catches and employment. – *Komun. Ryb*. 1, pp. 27–33.
- Economidis, P. S., Banarescu, P. M.** (1991). The distribution and origins of freshwater fishes in the Balkan Peninsula, especially in Greece. – *International Revue der Gesamten Hydrobiologie*. 76, pp. 257–283.
- Eesti Biokeskus.** (1986). [veebileht] <http://www.ebc.ee/index.php?lang=et> (02.02.2018).
- Eesti Entsüklopeedia. (s.a).** [veebileht] <http://entsyklopeedia.ee/artikkel/heteros%C3%BCgootsus> (5.05.2016).
- Eesti Punane Raamat.** (2008). Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon. [veebileht] <https://elurikkus.ee/> (12.04.16).
- Elvira, B.** (2001). Identification of non-native freshwater fishes established in Europe and assessment of their potential threats to the biological diversity. Strasbourg, France: Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. 35 p.

- Felsenstein, J.** (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Department of Genome Sciences. University of Washington, Seattle.
- Ferguson, M. M., Danzmann, R. G.** (1998). Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? – *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, pp. 1553–1563.
- Ferraris, C.** (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (*Osteichthyes: Siluriformes*), and catalogue of siluriform primary types. 1418. Auckland, New Zealand: Magnolia Press. 628 p.
- Fisheries administration in the field of aqua culture and restocking.** (1999). TemaNord. Nordic Council of Ministres, Copenhagen. Print_ Ekspressen Tryk & Kopicenter. 56 p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations.** [on-line] <http://www.fao.org/home/en/> (5.05.2016).
- Freyhof, J., Kottelat, M.** (2008). *Silurus glanis*. The IUCN Red List of Threatened. [on-line] <http://www.iucnredlist.org/details/40713/0> (30.12.2015).
- Froese, R., Pauly, D.** (2012). FishBase. [on-line] <http://www.fishbase.org> (7.01.2016).
- Genetic Science Learning Center.** (2016). Basic Genetics. [on-line] <http://learn.genetics.utah.edu/content/basics/> (21.01.2018).
- Goudet, J.** (2002). FSTAT version 2.9.3.2. [on-line] <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (30.01.2018).
- Goudet, J.** (2005). Principal Component Analysis (PCAGEN). [on-line] <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm> (01.04.2018).
- Gross, R.** (2015). Kalade geneetika ja aretus. Kalakasvatus. Perspektiivsed liigid / Päkk, P. (koostaja). Pärnu, Tartu Ülikooli Kalanduse Teabekeskus, lk 9–26.
- Guo, S. W., Thompson, E. A.** (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. – *Biometrics*. 48, No. 2, pp. 361–372.
- Hall, T.** (2005). Biological sequence alignment editor (BioEdit) version 7.0.5. [on-line] <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (31.01.2018).
- Hatsopoulos G., N.** (2006). Thermo Fisher Scientific. [on-line] <https://www.thermofisher.com/ee/en/home.html> (31.01.2018).
- Heinaru, A.** (2012). Geneetika: Õpik kõrgkoolile. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. 1135 lk.
- Hered, J., McElroy, D., Moran, P. Bermingham, E., Kornfield, I.** (1992). REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. 83(2), pp. 157–158.
- Hoelzel, A. R.** (1998). Molecular genetic analysis of populations: A practical approach. Second edition. IRL press at Oxford University press. 275 p.
- Hoffman, A. A., Blows, M. W.** (1994). Species borders: ecological and evolutionary perspectives. – *Trends in Ecology and Evolution*. 9, pp. 223–227.
- Hunt, T.** (2012). Eesti kalad. Tallinn: Kirjastus Varrak. 189 lk.

- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN.** (1948). [on-line] <https://www.iucn.org/> (20.05.2018).
- Jansson, J.** (2012). En limnisk gigant: Inventering och genetiska studier av europeisk mal (*Silurus glanis*) i nedre Helgeå. Masters thesis. Kristianstad University. 47 p.
- Kamangar, B. B., Rostamzadeh, J.** (2015). Genetic diversity and population genetic structure of Wels (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) in the northwest of Iran. – *Environmental Biology of Fishes*. Vol. 98, Issue 8. Springer Science, pp. 1927–1934.
- Kinzelbach, R.** (1992). Die westliche Verbreitungsgrenze des Welses, *Silurus glanis*, an Rhine und Elbe. – *Fischökologie*. 6, pp. 7–20.
- Koli, L.** (1990). Suomen kalat. Werner Söderström o/y, Porvoo. 357 p.
- Krieg, F., Estoup, A., Triantafyllidis, A., Guyomard, R.** (1999). Isolation of microsatellite loci in European catfish, *Silurus glanis*. – *Molecular ecology*. 8, pp. 1964–1966.
- Krieg, F., Triantafyllidis, A., Guyomard, R.** (2000). Mitochondrial DNA variation in European populations of *Silurus glanis*. – *Journal of Fish Biology*. Idealibrary. 56, pp. 713–724.
- Kucinski, M., Fopp-Bayat, D. K.** (2015). Example of the application the microsatellite DNA fragments in the study of farmed European catfish (*Silurus glanis*, L.) broodstock. – *Archives of Polish Fisheries*. 23, pp. 91–99.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.** (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 7.0 for bigger datasets. [on-line] <http://www.megasoftware.net/> (31.01.2018).
- Langella, O.** (1999). Populations version 1.2.30. [on-line] <http://bioinformatics.org/populations/> (30.01.2018).
- Lelek, A.** (1987). The Freshwater Fishes of Europe. Threatened fishes of Europe, AULA-Verlag Wiesbaden.
- Lelek, A., Libosvarsky, J., Penaz, M., Bezdek, R., Machacek, Z.** (1964). Observation on fish under ice in winter. – *Ekologia Polska* (Seeria A). 12, pp. 305–312.
- Linhart, O., Štěch, L., Švarc, J., Rodina, M., Audebert, J. P., Grecu J. and Billard, R.** (2002). The culture of the European catfish, *Silurus glanis*, in the Czech Republic and in France. – *Aquatic Living Resources*. 15, pp. 139–144.
- Masing, V.** (1992). Ökoloogialeksikon: Loodusteaduslik oskussõnastik. Tallinn: Eesti entsüklopeediakirjastus. 320 lk.
- McGraw-Hill Dictionary of Scientific & Technical Terms** (2003). [on-line] <https://encyclopedia2.thefreedictionary.com/genetic+differentiation> (20.05.2018).
- Meyer, A.** (1994). DNA technology and phylogeny of fish. In: Beaumont A.R. (ed.). Chapman and Hall, London. Molecular Systematics and Evolution of Marine Organisms, pp. 219–248.
- Mickiewicz, M., Draszkiewicz-Mioduszevska, H., Wolos, A.** (2014) State of Polish fisheries in flowing inland waters in 2012. Part 2. Stocking. – *Komun. Ryb.* 2, pp. 24–28.

- Mihalik, J.** (1995). Der Wels. Die Neue Brehm-Bucherei, 2nd edn. Westarp Wissenschaften, Magdeburg. 71 p.
- Mikelsaar, N.** (1984). Eesti NSV kalad. Tallinn: Valgus. 432 lk.
- Miller, P. J., Loates, M. J.** (1997). Euroopa kalad. Itaalia: Rotolito Lombarda. 228 lk. (Inglise keelest tõlkinud Raid, T. 2006).
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N. B., Inoue, J. G., Mukai, T., Satoh, T. P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., Shirai, S. M., Nishida, M.** (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. – *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26, pp. 121–138.
- Mohr, E.** (1957). Der Wels. Die neue Brehm-Bücherei, 209. A. Ziemsen Verlag. Wittenberg Lutherstadt. 43 p.
- Nei, M.** (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia university press. New York. 512 p.
- Nei, M., Chesser, R. K.** (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. – *Annals of human genetics*. 47, pp. 177–262.
- Nei, M., F. Tajima.** (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. – *Genetics*. 97, pp. 145–163.
- Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R.** (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. – *Evolution*. 29, pp. 1–10.
- Ojaveer, E.** (2014). Läänemeri. Tallinn: Teaduste akadeemia Kirjastus. 387 lk.
- Ojaveer, E., Pihu, E., Saat, T.** (2003). Fishes of Estonia. Tallinn: Estonian Academy Publishers. 416 p.
- Paaver, T., Kasesalu, J., Gross, R., Puhk, M., Tohver, T., Liiv, A., Aid, M.** (2006). Kalakasvatus ja kalade tervishoid. Tartu: Halo Kirjastus. 191 lk.
- Palm, S., Prestegard, T., Dannewitz, J., Petersson, E., Nathanson, E.** (2008). Genetisk kartläggning av svenska malbestånd. Uppsala university. 26 p.
- Pihu, E.** (2006). Meie kalad olelusvõitluses. Tallinn: Zero Gravity OÜ kirjastus „Kalastaja raamat“. 288 lk.
- Pihu, E., Turovski, A.** (2001). Eesti mageveekalad. Tallinn: Zero Gravity OÜ kirjastus. 240 lk.
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P.** (2009). Structure Software version 2.3.4. [on-line]. <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html> (30.01.2018).
- Rahel, F. J., Olden, J. D.** (2008). Assessing the effects of climate change on aquatic invasive species. – *Conservation Biology*. 22(3), pp. 521–533.
- Robinson, T. R.** (2010). Genetics for dummies. Wiley publishing. 366 p.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., Sánchez-Gracia, A.** (2018). DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) version 6.11.01. [on-line] <http://www.ub.edu/dnasp/> (31.01.2018).

- Rousset, F.** (2008). Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. – *Molecular Ecology Resources*. 8, pp. 103–106.
- Singh, A., Katiyar, P., Yadav, M., Tiwari, A.** (2011). Microsatellites: simple sequences with dynamic role in fish genetics. – *International Journal of Biomedical Research*. 2, pp. 123–137.
- Slone, C.** (2006). *Silurus glanis*. Animal Diversity Web. [on-line] http://animaldiversity.org/accounts/Silurus_glanis/ University of Michigan. (22.12.2015).
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. – *Molecular Biology and Evolution*. 24, pp. 1596–1599.
- Triantafyllidis, A., Abatzopoulos, T. J., Economidis, P. S.** (1999a). Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. – *Heredity*. 82, pp. 503–509.
- Triantafyllidis, A., Krieg, F., Cottin, C., Abatzopoulos, J., Triantaphyllidis, C., Guyomard, R.** (2002). Genetic structure and phylogeography of European catfish (*Silurus glanis*) populations. – *Molecular ecology*. 11, pp. 1039–1055.
- Triantafyllidis, A., Ozouf-Costaz, C., Rab, P., Suciu, R., Karakousis, Y.** (1999b). Allozyme variation in European silurid catfishes, *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis*. – *Biochemical Systematics and Ecology*. Pergamon, pp. 487–498.
- Vida, A., Kotai, T.** (2011). 365 kala (365 Fish). Tandem Verlag GmbH. 200 lk.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R. J.** (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. – *Nucleic Acids Research*. 31, pp. 3688–3691.
- Vinterstare, J.** (2017). Åtgärdsprogram för mal (*Silurus glanis*): Havs- och vattenmyndighetens rapport 2017:33. Göteborg, Sweden: Omslagsfoto: Helena Herngren. 63 p.
- Vittas, S., Drosopoulou, E., Kappas, I., Pantzartzi, C. N., Scouras Z. G.** (2011). The mitochondrial genome of the European catfish *Silurus glanis* (Siluriformes, Siluridae). – *Journal of Biological Research*. 15, pp. 25–35.
- Yamamoto, Y.** (2001). D-loop. Academic Press.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L.** (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. – *BMC Bioinformatics*. 13, 134 p.

GENETIC CHARACTERIZATION OF NATIVE POPULATION AND IMPORTED FARMED STOCKS OF WELS CATFISH (*SILURUS GLANIS* L.) IN ESTONIA

SUMMARY

Wels catfish is an endangered species in Estonia who is protected by Nature Conservation Act and also belongs to Red Data Book. Genetic characterization of wels catfish populations is important for species restoration programmes and aquaculture.

The aim of this thesis was to characterise genetically native population and imported farmed stocks of wels catfish (*Silurus glanis* L.) in Estonia and, furthermore, to assess suitability of imported stocks for restoring and enhancing of Estonian wels catfish populations. The material for this study was collected from four fish farms: Lapavira OÜ (originated from Lithuania), OÜ Karilatsi Kalamajand (origin is unknown), Kalatalu Härjanurmes and Störfisch OÜ (both originated from Latvia). The material from Estonian natural population was collected from lake Peipsi. Altogether 120 samples (pectoral fin clips) were collected from 2015 to 2017 and were stored in 96% ethanol: 106 samples from fish farms and 14 from lake Peipsi wels catfish population. Genetic characterisation of wels catfish stocks and population was done using mitochondrial and nuclear DNA variations. MtDNA variations were studied using PCR-RFLP analysis of ND5/6 and CytB/D-loop regions, and by sequencing of the D-loop, while nDNA variations were characterised using 20 microsatellite loci.

Sequencing of the mtDNA D-loop region revealed five haplotypes in the analyzed farmed stocks and natural population and those corresponded to three haplotypes which were found using PCR-RFLP method. Of those, haplotype H7 was the most frequent one and this haplotype has also been found from some of the populations from Caspian and Black sea catchment areas (from river Volga delta in Russia, and Puiu lake and Prut river in Romania). Two unique haplotypes were found within this study which have never been described before. The haplotypes found in fish farms stocks and lake Peipsi population are characteristic for the Baltic sea catchment area and are genetically similar to most of the previously studied Black, Caspian sea and Atlantic ocean catchment area haplotypes. However, haplotypes described in this study differ greatly from haplotypes which are

characteristic to the Mediterranean sea catchment area. The highest genetic variability within the D-loop region was found in the Lapavira stock which originated from Lithuania whereas the lake Peipsi population and the farmed stocks of Latvian origin were fixed for the same haplotype. This could be caused by small effective population size or by founder effect when northern areas were recolonized after ice age.

The imported to Estonia farmed wels catfish stocks and the lake Peipsi natural population are maternally most similar to Romania Puiu lake and Prut river populations and form a group together with populations from the Black, Caspian sea and Atlantic ocean catchment areas and this group is distinct from the Mediterranean sea Greek populations group. The Lake Peipsi population is maternally the most similar to the farmed stocks of Latvian origin although the difference from the Lapavira stock of Lithuanian origin is also marginal.

The analysis of 20 microsatellite loci revealed altogether 107 alleles or 5,4 alleles per locus in the studied farmed stocks and native population. The Lapavira stock of Lithuanian origin had a higher genetic variability than the lake Peipsi population and the farmed stocks of Latvian origin. At the same time, the average observed heterozygosity of the lake Peipsi population was significantly lower than of all imported farmed stocks. Also, the inbreeding coefficient of Peipsi population was relatively high which could be caused by very low effective number of breeders. In contrast, the farmed stocks of Latvian origin had a negative inbreeding coefficient which could be the result of using very low numbers of breeders for reproduction. Based on microsatellite markers, the native lake Peipsi population is genetically the most similar to the Lapavira stock of Lithuanian origin but the difference from stocks of Latvian origin is also not very high.

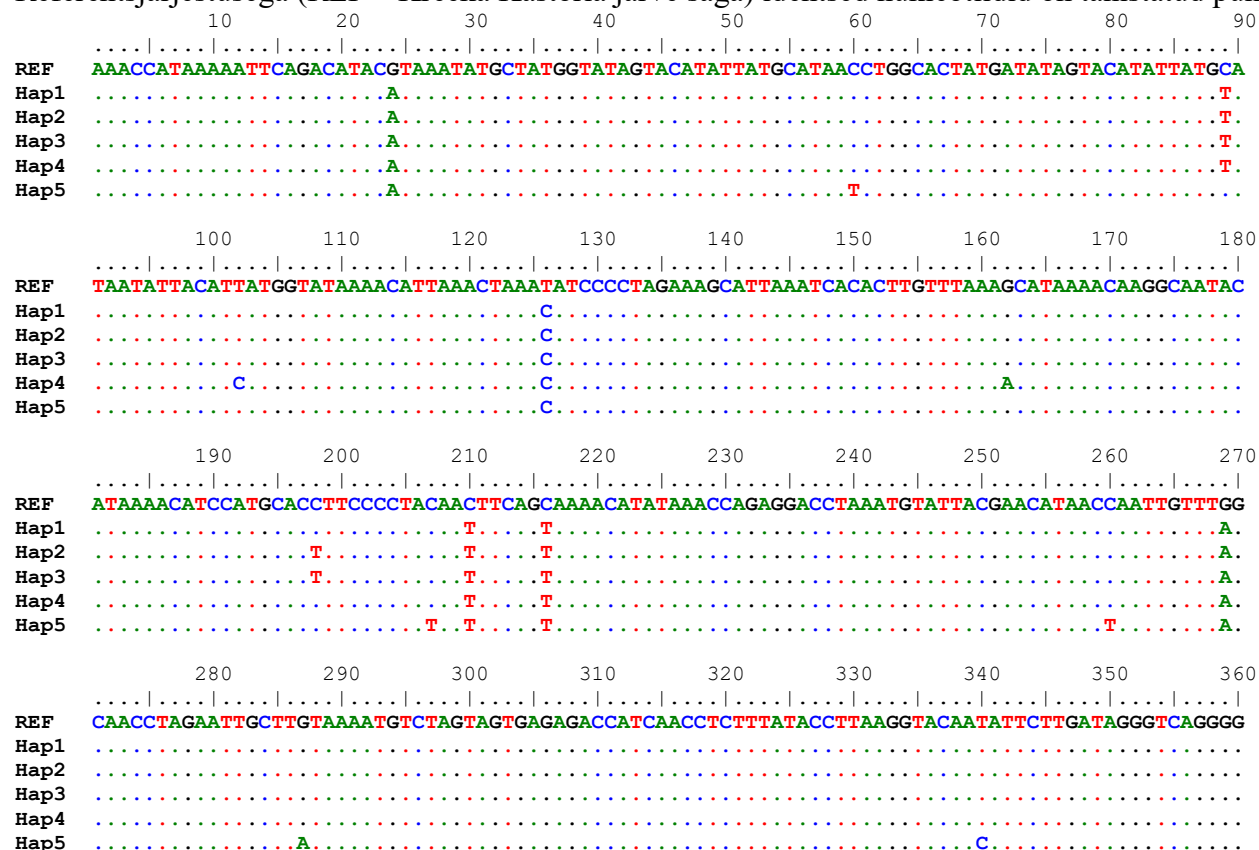
The results of this study confirmed our first hypothesis that the native Peipsi population and the farmed stocks which were imported from Latvia and Lithuania are genetically similar by maternal lines and differ from previously studied populations in other parts of Europe. Also we were partially able to confirm our second hypothesis that the imported farmed wels catfish stocks which originated from Latvia and Lithuania could be genetically suitable for enhancing the native Peipsi population in Estonia. Analysis of genetic markers showed that the Lapavira stock which originated from Lithuania was genetically the most variable among studied stocks and it was also the most similar to Peipsi native population. Therefore, it would be the most suitable for enhancing the native Peipsi population, allowing to increase

the level of its genetic variation and to liquidate the accumulated inbreeding. According to the „Estonian fish restocking programme“, the enhancement and restocking of wels catfish populations requires preparatory studies because the possibilities how to get populations in such a good state so fishermen could catch them, are not clear yet. This master's thesis is an important part of these preparatory studies before the restocking and enhancement activities could be started.

LISAD

Lisa 1. Joondatud säga D-lingu haplotüüpide järjestused.

Referentsjärjestusega (REF – Kreeka Kastoria järve säga) identsed nukleotiidid on tähistatud punktiiriga



Lisa 1 järg

	370	380	390	400	410	420	430	440	450		
REF										
	C A A A A C T T G T G G G G G T T G C A C A G C T T G C A C T A T T A C T G G C A T C T G G T T C C T A T T T C A G G T C C A T A A C T G G A T T A T T C C A C C T A T C A T A C A										
Hap1 T .									
Hap2 T .									
Hap3 T .									
Hap4 T .									
Hap5 C . T .									
	460	470	480	490	500	510	520	530	540		
REF										
	T T A T C C T G G C A T A A G G T A A T G G T G G G A C A A C G A A T T A G C A A A C A C C C C C A T G C C A A G G C C T T C A T T T A A A G G C A T G G G G T T T C T T T T T T										
Hap1 T .									
Hap2 T .									
Hap3 T .									
Hap4 T .									
Hap5 T .									
	550	560	570	580	590	600	610	620	630		
REF										
	T T G G G - T C A C T T T C A C C T G G C A A T T T C A T G C A T C C T A C C A C A A T C C G T G G A A A G A G T C C A T A C A T A A T G T T A T T T C A A G G A A T G T A T G T G										
Hap1 G C T .									
Hap2 G C T .									
Hap3 G C T .									
Hap4 G C T .									
Hap5 G C .									
	640	650	660	670	680	690	700	710	720		
REF										
	C A T G T T T T A A T G A C A T A A C T G A A C C A C G C A T A T A C T C T A T T C C A C G T G C A T A A G G T T A T T C T T T A C T C C A C A T A C T C C T A T G A G A T T G C C										
Hap1 G T . - .									
Hap2 T . - A .									
Hap3 T . - G A .									
Hap4 T . - . T .									
Hap5 T . -									
	730	740	750	760	770	780	790	800	810		
REF										
	C C C C C T C T T C C C T C G C G T A C G C G C G G C A A A C C C C C T A C C C C C A C G C C C A G C G A G T C C T A A T T A A T C C T G T C A A A C C C C A A A G C A G										
Hap1									
Hap2									
Hap3									
Hap4									
Hap5									

Lisa 1 järg

[illegible]

Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks (avaldamise tähtajatu piirang) ning juhendaja(te) kinnitus töö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Katrina Lang,
sünniaeg 18.05.1994,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö:

Säga (*Silurus glanis* L.) loodusliku populatsiooni ja Eestisse imporditud kasvanduste karjade geneetiline iseloomustamine [Genetic characterization of native population and imported farmed stocks of wels catfish (*Silurus glanis* L.) in Estonia], mille juhendajad on professor Riho Gross ja teadur Lilian Pukk

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

Tartu, _____

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)